

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 691**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/706** (2006.01)

**A61K 31/7068** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/GB2012/050815**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12140436**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12717824 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2696878**

54 Título: **Régimen de dosis para sapacitabina y decitabina en combinación para tratar la leucemia mieloide aguda**

30 Prioridad:

**14.04.2011 GB 201106339**

**13.10.2011 GB 201117693**

**08.12.2011 GB 201121105**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.02.2020**

73 Titular/es:

**CYCLACEL LIMITED (100.0%)**

**New Bridge Street House, 30 - 34 New Bridge Street**

**London EC4V 6BJ, GB**

72 Inventor/es:

**CHIAO, JUDY**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 743 691 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Régimen de dosis para sapacitabina y decitabina en combinación para tratar la leucemia mieloide aguda

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo régimen de dosificación apropiado para el tratamiento del cáncer y otros trastornos proliferativos.

## 10 Antecedentes de la invención

Las ADN metiltransferasas son una familia de enzimas que promueven la adición covalente de un grupo metilo a una base de nucleótidos específica en una molécula de ADN. Todas las ADN metiltransferasas conocidas usan S-adenosil metionina (SAM) como donante de metilo. Se han identificado cuatro ADN metiltransferasas activas en mamíferos. Se denominan DNMT1, DNMT2, DNMT3A y DNMT3B.

El DNMT1 es la ADN metiltransferasa más abundante en células de mamífero y se considera que la metiltransferasa de mantenimiento es clave en mamíferos. Principalmente metila los dinucleótidos CpG hemimetilados en el genoma de los mamíferos y es responsable de mantener los patrones de metilación establecidos en el desarrollo. La enzima tiene aproximadamente 1620 aminoácidos de longitud, los primeros 1100 aminoácidos constituyen el dominio regulador y los residuos restantes constituyen el dominio catalítico. A estos se unen las repeticiones de Gly-Lys. Ambos dominios son necesarios para la función catalítica de DNMT1. DNMT3 es una familia de ADN metiltransferasas que pueden metilar CpG hemimetilado y no metilado a la misma velocidad. La arquitectura de las enzimas DNMT3 es similar a la DNMT1 con una región reguladora unida a un dominio catalítico.

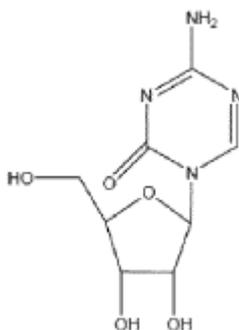
Un trabajo reciente ha revelado cómo la metilación del ADN y la estructura de la cromatina están vinculadas a nivel molecular y cómo las anomalías de metilación juegan un papel causal directo en la tumorigénesis y la enfermedad genética. Mucha información nueva también ha salido a la luz con respecto a las ADN metiltransferasas, en términos de su papel en el desarrollo de los mamíferos y los tipos de proteínas con las que se sabe que interactúan. En lugar de las enzimas que actúan de forma aislada para copiar patrones de metilación después de la replicación, los tipos de interacciones descubiertas hasta ahora indican que las ADN metiltransferasas pueden ser componentes de complejos más grandes que participan activamente en el control transcripcional y la modulación de la estructura de la cromatina. Estos hallazgos deberían mejorar la comprensión de los innumerables roles de la metilación del ADN en la enfermedad, así como también conducir a nuevas terapias para prevenir o reparar estos defectos.

Los inhibidores de la ADN metiltransferasa de molécula pequeña están bien documentados en la técnica e incluyen, por ejemplo, decitabina, azacitabina, zebularina, procainamida, procaína, hidralazina, ((-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) y RG108.

La decitabina o la 5-aza-2'-desoxicidina (nombre comercial Dacogen) es el compuesto 4-amino-1-(2-desoxi-β-D-eritropentofuranosilo)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona.

La azacitidina (nombre comercial Vidaza) es el compuesto 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-s-triazin-2(1H)-ona, cuya estructura se muestra a continuación.

45



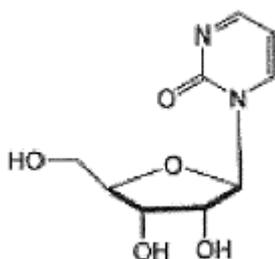
La azacitidina es un análogo nucleosídico de pirimidina antineoplásico usado para tratar varios subtipos de síndrome mielodisplásico, enfermedades causadas por anomalías en las células formadoras de sangre de la médula ósea que dan como resultado la producción insuficiente de células sanguíneas sanas. El fármaco ejerce un efecto citotóxico en las células que se dividen rápidamente, incluidas las células cancerosas, y puede ayudar a restaurar la función normal de los genes que controlan la apropiada diferenciación y proliferación celular.

50

La azacitidina está específicamente indicada para el tratamiento de los siguientes subtipos de síndrome mielodisplásico: anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados (si se acompaña de neutropenia o trombocitopenia o que requieren transfusiones), anemia refractaria con blastos excesivos, anemia refractaria con blastos excesivos en transformación y leucemia mielomonocítica crónica.

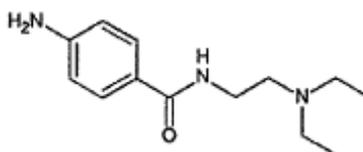
Se cree que la azacitidina ejerce sus efectos antineoplásicos al provocar la hipometilación del ADN y la citotoxicidad directa en células hematopoyéticas anormales en la médula ósea. La concentración de azacitidina requerida para la inhibición máxima de la metilación del ADN in vitro no causa una supresión importante de la síntesis de ADN. La hipometilación puede restaurar la función a genes que son críticos para la diferenciación o proliferación. Los efectos citotóxicos de la azacitidina causan la muerte de las células que se dividen rápidamente, incluidas las células cancerosas que ya no responden a los mecanismos normales de control del crecimiento. Las células no proliferantes son relativamente insensibles a la azacitidina.

Otro inhibidor de ADN metiltransferasa conocido es la zebularina, también conocida como 1-(β-D-ribofuranosil)-1,2-dihidropirimidin-2-ona o 2-pirimidona-1-β-D-ribósido, cuya estructura se muestra a continuación.



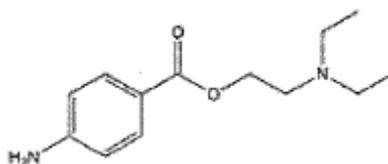
Otros inhibidores de ADN metiltransferasa conocidos son análogos no nucleósidos, por ejemplo, procainamida, procaína, hidralazina y (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG).

La procainamida (nombres comerciales Pronestyl, Procan, Procanbid) es el compuesto 4-amino-N-(2-dietilaminoetil) benzamida, cuya estructura se muestra a continuación.



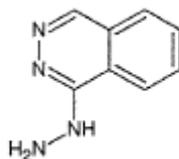
Se ha demostrado que la procainamida inhibe la actividad de la ADN metiltransferasa y reactiva la expresión de genes silenciados en las células cancerosas al revertir la hipermetilación de la isla CpG. La procainamida inhibe específicamente la actividad hemimetilasa de la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), la enzima de los mamíferos que se cree que es responsable de mantener los patrones de metilación del ADN durante la replicación.

La procaína es el compuesto 2-(dietilamino)etil-4-aminobenzoato, cuya estructura se muestra a continuación.



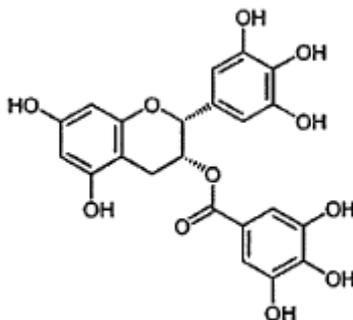
La procaína es un agente de desmetilación del ADN que se entiende que inhibe las ADN metiltransferasas al interferir con la actividad enzimática.

La hidralazina (Apresolina) es el compuesto monohidrato de la 1-hidrazinoftalazina, cuya estructura se muestra a continuación.



(-)-Epigallocatequin-3-galato (EGCG) es un análogo de catequina que tiene la estructura que se muestra a continuación.

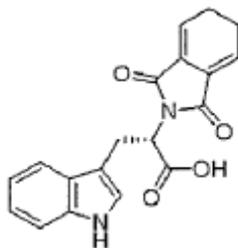
5



Se entiende que EGCG inhibe la actividad de DNMT y reactiva los genes silenciados por metilación en células cancerosas.

10

Otro inhibidor de ADN metiltransferasa conocido es RG108, también conocido como N-ftalil-1-triptófano, cuya estructura se muestra a continuación.



15

RG108 es un inhibidor de ADN metiltransferasa que se entiende que inhibe las ADN metiltransferasas al interferir con la actividad enzimática. En particular, se cree que RG108 reactiva la expresión del gen supresor tumoral (p16, SFRP1, proteína 1 relacionada con frizzled secretados y TIMP-3) en células tumorales por desmetilación de ADN. RG108 también inhibe la proliferación de la línea celular tumoral humana (HCT116, NALM-6) y aumenta el tiempo de duplicación en cultivo.

20

Baer et al (2011, 9, J. Nat. Comp. Cancer Network. 331-335) describe el uso de decitabina como monoterapia en estudios de fase II en pacientes de edad avanzada con leucemia mieloide aguda. Kantarjian et al (2009, 28, J. Clin. Oncol. 285-291) describe el uso de sapacitabina o metabolito de la misma 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-citosina (CNDAC) como monoterapia en un estudio clínico en pacientes de edad avanzada con leucemia mieloide aguda.

25

Está bien establecido en la técnica que los agentes farmacéuticos activos a menudo se pueden administrar en combinación para optimizar el régimen de tratamiento.

30

Qin T et al (2007, 13, Clin. Cancer Res. 4225-4232) describen el efecto de combinaciones de citarabina y decitabina en diversas líneas celulares leucémicas humanas. Del mismo modo, Kong XB et al (1991, Molecular Pharmacol. 39, 250-257) sugieren que la 5-azacitidina causa un aumento de la regulación de dCK en una línea celular que es resistente a la citarabina, lo que resulta en una disminución en el valor de IC<sub>50</sub> para la citarabina de 12.5 a 0.55 μM.

35

Combinaciones de inhibidores de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina (también conocida como "CYC682" o sapacitabina), o un metabolito de la misma, se describen en WO 2009/150405 (Cyclacel Limited). Las composiciones farmacéuticas que comprenden tales combinaciones y su uso en el tratamiento de diversos trastornos proliferativos también se describen en el documento WO 2009/150405.

40

La presente invención busca proporcionar un nuevo régimen de dosificación para agentes farmacéuticos conocidos que sea particularmente apropiado para el tratamiento de trastornos proliferativos, especialmente leucemia mieloide aguda (AML). Más específicamente, la invención se centra en los efectos sorprendentes e inesperados asociados con el uso de ciertos agentes farmacéuticos en combinación.

Declaración de invención

La presente invención proporciona (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y la decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento, en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz terapéuticamente de decitabina durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o metabolito de la misma, en una dosis de 100 a 400 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

La presente invención también proporciona (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML en un sujeto de edad avanzada, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y decitabina, se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento, en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina o metabolito de la misma de la misma por vía oral en una dosis de 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguido de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

También se describe en este documento un método de tratamiento de la AML en un sujeto, dicho método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

En este documento también se describe un método de tratamiento de AML en un sujeto de edad avanzada, dicho método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) sapacitabina; y (ii) decitabina; de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

En este documento también se describe (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML, en el que la sapacitabina, o un metabolito de la misma, y la decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

5 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

10 En este documento también se describe (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML en un sujeto de edad avanzada, en el que la sapacitabina, o el metabolito de la misma, y la decitabina, se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

15 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

20 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

25 En este documento también se describe (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; en la preparación de un medicamento para tratar la AML, en el que la sapacitabina, o un metabolito de la misma, y la decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

30 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

35 En este documento también se describe (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; en la preparación de un medicamento para tratar la AML en un sujeto de edad avanzada, en el que la sapacitabina, o el metabolito de la misma, y la decitabina, se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

40 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

45 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

50 En este documento también se describe un kit de partes que comprende:

(i) sapacitabina, o un metabolito de la misma;

(ii) decitabina; y

55 (iii) instrucciones para administrar sapacitabina, o un metabolito de la misma, y decitabina de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

60 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

65 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

En este documento también se describe un kit de partes que comprende:

(i) sapacitabina, o un metabolito de la misma;

(ii) decitabina; y

(iii) instrucciones para administrar sapacitabina, o un metabolito de la misma, y decitabina de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

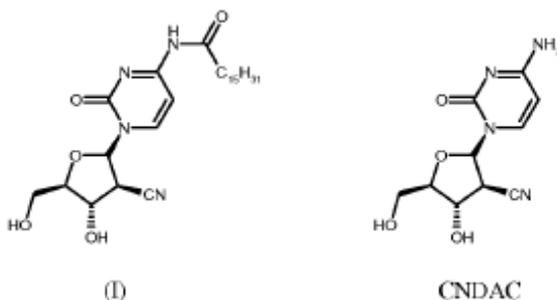
Descripción detallada

El efecto de las combinaciones de fármacos es inherentemente impredecible y, a menudo, existe una propensión a que un fármaco inhiba parcial o completamente los efectos del otro. La presente invención se basa en la sorprendente observación de que la administración de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina y decitabina de acuerdo con un régimen de dosificación particular no conduce a ninguna interacción adversa entre los dos agentes. La inesperada ausencia de cualquier interacción antagónica es crítica para las aplicaciones clínicas.

En una realización preferida, el régimen de dosificación de la invención produce un efecto mejorado en comparación con cualquier fármaco administrado solo. La naturaleza sorprendente de esta observación contrasta con la esperada sobre la base de la técnica anterior.

Además, el régimen de dosificación actualmente reivindicado es bien tolerado y da lugar a excelentes tasas de respuesta, buenas tasas de supervivencia global y ausencia de toxicidades superpuestas o acumulativas.

La 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina (I), también conocida como 2'-ciano-2'-desoxi- N<sup>4</sup>-palmitoil-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Hanaoka, K., et al, Int. J. Cancer, 1999:82:226-236; Donehower R, et al, Proc Am Soc Clin Oncol, 2000: resumen 764; Burch, PA, et al, Proc Am Soc Clin Oncol, 2001: resumen 364), es un nuevo profármaco antimetabolito 2'-desoxicitidina administrado por vía oral del nucleósido CNDAC, 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β- D-arabino-pentofuranosil)-citosina.

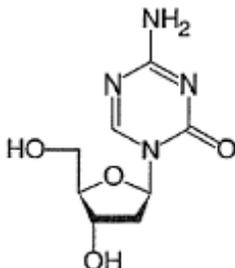


La 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N-palmitoil citosina (I) (también conocida como "CYC682" o sapacitabina) tiene un modo de acción único sobre otros metabolitos nucleósidos tales como la gemcitabina, ya que tiene una acción espontánea de ruptura de la cadena de ADN, lo que resulta en una potente actividad antitumoral en una variedad de líneas celulares, xenoinjerto y modelo de cáncer metastásico.

La 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina (I) ha sido el foco de una serie de estudios en vista de su biodisponibilidad oral y su actividad mejorada sobre gemcitabina (el principal análogo de nucleósido comercializado) y 5-FU (un fármaco antimetabolito ampliamente usado) basado en datos preclínicos en tumores sólidos. Recientemente, los investigadores informaron que (I) exhibió una fuerte actividad anticancerígena en un modelo de cáncer de colon. En el mismo modelo, (I) se descubrió que era superior a ya sea la gemcitabina o al 5-FU en términos de aumentar la supervivencia y también prevenir la propagación de metástasis de cáncer de colon al

hígado (Wu M, et al, Cancer Research, 2003:63:2477-2482). Hasta la fecha, los datos de fase I de pacientes con una variedad de cánceres sugieren que (I) es bien tolerado en humanos, con mielosupresión como la toxicidad limitante de la dosis.

- 5 El inhibidor de la ADN metiltransferasa usado en el régimen de dosificación de la presente invención es la decitabina. La decitabina o 5-aza-2'-desoxicitidina (nombre comercial Dacogen) es el compuesto 4-amino-1-(2-desoxi-β-D-eritro-pentofuranosil)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona, cuya estructura se muestra a continuación.



- 10 La decitabina está indicada para el tratamiento de los síndromes mielodisplásicos (MDS), incluidos los MDS de novo y secundarios previamente tratados y no tratados de todos los subtipos franco-americanos-británicos (anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con blastos excesivos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica crónica) e intermedios-1, intermedios-2 y grupos de sistema de puntuación de pronóstico internacional de alto riesgo.

- 15 Se cree que la decitabina ejerce sus efectos antineoplásicos después de la fosforilación y la incorporación directa en el ADN. La decitabina inhibe la ADN metiltransferasa, causando la hipometilación del ADN y la diferenciación celular o apoptosis. La hipometilación inducida por decitabina en las células neoplásicas puede restaurar la función normal de los genes que son críticos para el control de la diferenciación y proliferación celular. En las células que se dividen rápidamente, la citotoxicidad de la decitabina también se puede atribuir a la formación de aductos covalentes entre la  
20 ADN metiltransferasa y el compuesto que se ha incorporado al ADN. Las células no proliferantes son relativamente insensibles a la decitabina.

- Como se usa en este documento, la frase "preparación de un medicamento" incluye el uso de los componentes de la invención directamente como el medicamento además de su uso en cualquier etapa de la preparación de dicho  
25 medicamento.

- En una realización preferida, la decitabina y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina se administran cada una en una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales; en otras palabras, la decitabina y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil  
30 citosina se administran en cantidades que serían terapéuticamente efectivas incluso si los componentes fueron administrados de otra manera que en combinación.

- En otra realización preferida, la decitabina y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)- N<sup>4</sup>-palmitoil citosina se administran cada una en una cantidad subterapéutica con respecto a los componentes individuales; en  
35 otras palabras, la decitabina y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina se administran en cantidades que serían terapéuticamente ineficaces si los componentes fueron administrados de otra manera que en combinación.

- Preferiblemente, la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina y la decitabina interactúan de manera sinérgica. Como se usa en este documento, el término "sinérgico" significa que la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)- N<sup>4</sup>-palmitoil citosina y la decitabina producen un efecto mayor cuando se usan en  
40 combinación de lo que cabría esperar al agregar los efectos individuales de los dos componentes. Ventajosamente, una interacción sinérgica puede permitir que se administren dosis más bajas de cada componente a un paciente, disminuyendo así la toxicidad de la quimioterapia, mientras que produce y/o mantiene el mismo efecto terapéutico.  
45 De este modo, en una realización particularmente preferida, cada componente se puede administrar en una cantidad subterapéutica.

#### Regímenes de dosificación específicos para AML

- 50 Estudios previos realizados por el solicitante han demostrado que en las líneas celulares de AML, el metabolito activo de sapacitabina, CNDAC, es sinérgico con los agentes hipometilantes y la sinergia es más evidente si las células se tratan primero con agentes hipometilantes.

- Un aspecto de la invención se refiere a (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y la  
55 decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de

tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento, en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

5 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o metabolito de la misma, en una dosis de 100 a 400 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

10 También se describe en este documento un método de tratamiento de AML en un sujeto, dicho método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

15 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

20 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

25 Las realizaciones preferidas expuestas a continuación se aplican igualmente a todos los aspectos de la invención.

En una realización preferida, el segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina.

30 La administración secuencial de decitabina y sapacitabina en ciclos alternos de acuerdo con el régimen de dosificación actualmente reivindicado maximiza la eficacia de ambos fármacos y minimiza la mielosupresión superpuesta.

35 El primer y segundo ciclos de tratamiento se repiten secuencialmente con períodos de descanso entre ciclos secuenciales, esto es, hay un período de descanso entre el último día de administración de decitabina y el primer día del segundo ciclo de tratamiento; asimismo, hay un período de descanso entre el último día de administración de sapacitabina y el primer día del próximo (primer) ciclo de tratamiento. Preferiblemente, el período de descanso es suficiente para resolver cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento.

40 Como se usa en este documento, las toxicidades relacionadas con el tratamiento son principalmente mielosupresión y sus complicaciones asociadas.

45 En una realización preferida, el primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

En una realización preferida, el primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 días seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas.

50 En una realización más preferida, el primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 días seguido de un período de descanso de 3 semanas.

55 En este documento también se describe un régimen de dosificación en el que el primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

60 En este documento también se describe un régimen de dosificación en el que el primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 10 días seguido de un período de descanso de 4 semanas.

En una realización preferida, el segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina o metabolito de la misma durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas, seguido de un período de descanso de 2 a 4 semanas.

65

En una realización más preferida, el segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina o metabolito de la misma durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas, seguido de un período de descanso de 2 semanas.

5 En una realización preferida, el método comprende dos o más de cada ciclo de tratamiento, más preferiblemente, tres o más, cuatro o más, o cinco o más de cada ciclo de tratamiento.

En una realización altamente preferida, el método comprende cuatro o más de cada ciclo de tratamiento.

10 En una realización altamente preferida, el método comprende de dos a cuatro de cada ciclo de tratamiento.

En una realización preferida, la decitabina se administra por vía intravenosa.

15 En una realización preferida, la decitabina se administra en una dosis desde aproximadamente 10 a 20 mg/m<sup>2</sup> por día.

En una realización más preferida, la decitabina se administra en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día. En ciertas realizaciones preferidas, la dosificación de decitabina se puede adaptar a pacientes individuales dentro del mismo programa para mitigar los efectos secundarios. Por ejemplo, en ciertas realizaciones preferidas, la dosis de decitabina se puede reducir (por lo general en incrementos de 5 mg/m<sup>2</sup>) de una dosis inicial de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día, a aproximadamente 15 mg/m<sup>2</sup> por día, o aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup> por día.

20 En una realización preferida, la decitabina se administra durante un período de hasta 3 horas por día, más preferiblemente durante un período de hasta 2 horas por día, incluso más preferiblemente durante un período de aproximadamente 1 hora por día.

25 En una realización preferida, el primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> durante 10 días, seguido de un período de descanso de 4 semanas.

30 En una realización preferida, la sapacitabina o metabolito de la misma se administra por vía oral.

35 En una realización preferida, la sapacitabina o metabolito de la misma se administra en una dosis de 100-400 mg b.i.d., más preferiblemente 250-300 mg b.i.d.

40 En una realización más preferida, la sapacitabina o metabolito de la misma se administra en una dosis de 300 mg b.i.d. En ciertas realizaciones preferidas, la dosificación de sapacitabina se puede adaptar a pacientes individuales dentro del mismo programa para mitigar los efectos secundarios. Por ejemplo, en ciertas realizaciones preferidas, la dosis de sapacitabina se puede reducir (por lo general en incrementos de 50 mg) a partir de una dosis inicial de 300 mg b.i.d. a 250 mg b.i.d., a 200 mg b.i.d., a 150 mg b.i.d., o a 100 mg b.i.d.

45 En una realización preferida, el sujeto es un sujeto de edad avanzada. Como se usa en este documento, el término "sujeto de edad avanzada" se refiere a un sujeto de 60 años o más. Más preferiblemente, el sujeto tiene 65 años o más, incluso más preferiblemente, 70 años o más, más preferiblemente aún, 75 años o más.

50 También se describe en este documento un método de tratamiento de AML en un sujeto de edad avanzada, dicho método comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) sapacitabina; y (ii) decitabina; de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

55 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

60 En una realización altamente preferida, el régimen de dosificación comprende administrar decitabina a 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 días consecutivos de un ciclo de 4 semanas (ciclos impares) y sapacitabina secuencialmente a 300 mg por vía oral dos veces al día, durante tres días por semana durante dos semanas de un ciclo de 4 semanas (ciclos pares).

65 En este documento también se describe un método de tratamiento de la AML en un sujeto de edad avanzada, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) sapacitabina; y (ii)

decitabina; de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

5 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

10 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

15 En este documento también se describe un régimen de dosificación que comprende administrar decitabina a 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 10 días consecutivos de un ciclo de 4 semanas (ciclos impares) y sapacitabina secuencialmente a 300 mg por vía oral dos veces al día, durante tres días a la semana, durante dos semanas de un ciclo de 4 semanas (ciclos pares).

20 En este documento también se describe (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; para usar en el tratamiento de la AML,

en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y la decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

25 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 o 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

30 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML en un sujeto de edad avanzada, en el que la sapacitabina, o el metabolito de la misma, y la decitabina, se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

40 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

45 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

50 También se describe en este documento el uso de (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; en la preparación de un medicamento para tratar la AML, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y la decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 o 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

55 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

60 También se describe en este documento el uso de (i) sapacitabina, o un metabolito de la misma; y (ii) decitabina; en la preparación de un medicamento para tratar la AML en un sujeto de edad avanzada, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y la decitabina se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 o 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

5 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

10 Kit de partes

En este documento también se describe un kit de partes que comprende:

(i) sapacitabina, o un metabolito de la misma;

15 (ii) decitabina; e

(iii) instrucciones para administrar sapacitabina, o un metabolito de la misma, y decitabina de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de

20 tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

25 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o un metabolito de la misma, durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

30 En este documento también se describe un kit de partes que comprende:

(i) sapacitabina, o un metabolito de la misma;

35 (ii) decitabina; e

(iii) instrucciones para administrar sapacitabina, o un metabolito de la misma, y decitabina de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de

40 tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup> durante 5 a 10 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

45 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina por vía oral en una dosis de aproximadamente 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.

50 Preferiblemente, el kit de partes es para su uso en el tratamiento de ALM en un sujeto, preferiblemente un sujeto de edad avanzada.

Metabolito

55 Como se usa en este documento, el término "metabolito" abarca entidades químicamente modificadas que se producen por el metabolismo de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina.

En una realización particularmente preferida de la invención, el metabolito de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabinopentofuranosil)- N<sup>4</sup>-palmitoil citosina es 2'-C-ciano-2'-desoxi-1-β-D-arabino-pentofuranosil-citosina (CNDAC).

60 En otra realización particularmente preferida de la invención, 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)- N<sup>4</sup>-palmitoil citosina se metaboliza intracelularmente al metabolito activo CNDAC-trifosfato (CNDACTP), un procedimiento que implica tanto la escisión de la unidad estructural palmitoil como la activación de CNDACTP por la acción de las nucleósidos quinasas.

65 Sales/ésteres

Los agentes de la presente invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la invención incluyen las apropiadas sales de adición de ácido o base de los mismos. Se puede encontrar una revisión de sales farmacéuticas apropiadas en Berge *et al*, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como los ácidos minerales, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos hidrohálidos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tal como el ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)- o aril-sulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tales como ácido metano o p-toluenosulfónico.

Los ésteres se forman usando ya sea ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esterifica. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que están no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tal como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)- o aril-sulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tales como ácido metano o p-toluenosulfónico. Los hidróxidos apropiados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Los alcoholes incluyen alcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden estar no sustituidos o sustituidos, por ejemplo, por un halógeno).

#### Enantiómeros/tautómeros

La invención también incluye, cuando sea apropiado, todos los enantiómeros y tautómeros de los agentes. El experto en el arte reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes se pueden aislar/preparar mediante métodos conocidos en la técnica.

#### Isómeros estereo y geométrico

Algunos de los agentes de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y, por lo tanto, pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros individuales e isómeros geométricos de esos agentes inhibidores, y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas apropiadas del agente o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como una en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica que se encuentra generalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en el agente y sus sales farmacéuticamente aceptables incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F y <sup>36</sup>Cl, respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y las sales farmacéuticamente de los mismos, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tales como <sup>3</sup>H o <sup>14</sup>C, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o tejidos de sustrato. Los isótopos tritados, esto es, <sup>3</sup>H, y carbono-14, esto es, <sup>14</sup>C, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como el deuterio, esto es, <sup>2</sup>H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida in vivo aumentada o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, se puede preferir en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de esta invención generalmente se pueden preparar mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos apropiados.

#### Solvatos

La presente invención también incluye formas de solvato de los agentes de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

#### Polimorfos

La invención además se refiere a agentes de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas (an)hidras. Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos se pueden aislar en cualquiera de tales formas variando ligeramente el método de purificación y/o aislamiento de los solventes usados en la preparación sintética de tales compuestos.

#### Profármacos

También se describen agentes de la presente invención en forma de profármaco. Tales profármacos son generalmente compuestos en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de modo que la modificación se puede revertir tras la administración a un sujeto humano o mamífero. Tal reversión generalmente es realizada por una enzima presente naturalmente en tal sujeto, aunque es posible que un segundo agente se administre junto con dicho profármaco para realizar la reversión in vivo. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente), en el que la reversión se puede llevar a cabo como una esterasa, etc. Otros sistemas de este tipo serán bien conocidos para los expertos en el arte.

#### Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden adaptar para las rutas de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

Para la administración oral, se hace uso particular de comprimidos por compresión, píldoras, comprimidos, pastillas, gotas y cápsulas. Preferiblemente, estas composiciones contienen desde 1 a 2000 mg y más preferiblemente desde 50-1000 mg, de ingredientes activos por dosis.

Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que se pueden inyectar por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular, y que se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, aerosoles, soluciones o polvos de polvo.

Un medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche para la piel. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede incorporar en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El ingrediente activo también se puede incorporar, a una concentración de entre 1 y 10% en peso, en un ungüento que consiste en una cera blanca o una base de parafina blanda blanca junto con los estabilizantes y conservantes que se requieran.

Las formas inyectables pueden contener entre 10-1000 mg, preferiblemente entre 10-500 mg, de ingrediente activo por dosis.

Las composiciones se pueden formular en forma de dosificación unitaria, esto es, en forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria, o una unidad múltiple o subunidad de una dosis unitaria.

En una realización particularmente preferida, la combinación o composición farmacéutica de la invención se administra por vía intravenosa.

#### Dosificación

Un experto en el arte puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas para administrar a un sujeto sin experimentación excesiva. Por lo general, un médico determinará la dosis real que será más apropiada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia que recibe el individuo. Las dosis descritas en este documento son de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se merecen intervalos de dosificación más altos o más bajos.

Dependiendo de la necesidad, el agente se puede administrar a una dosis desde 0.1 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como desde 2 a 20 mg/kg, más preferiblemente desde 0.1 a 1 mg/kg de peso corporal.

A modo de orientación, la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoil citosina se administra por lo general de acuerdo con la dirección de un médico a dosis totales de entre 100 mg y 800 mg por día. Preferiblemente, la dosis se administra por vía oral. Las dosis se pueden administrar 5 días a la semana durante 4 semanas o 3 días a la semana durante 4 semanas. Las dosis y la frecuencia de aplicación se adaptan por lo general a la condición médica general del paciente y a la severidad de los efectos adversos causados, en particular a los

causados al sistema hematopoyético, hepático y renal. La dosis diaria total se puede administrar como una dosis única o dividirse en dosis separadas administradas dos, tres o cuatro veces al día.

El inhibidor de ADN metiltransferasa decitabina (Dacogen®) se administra por lo general por vía subcutánea o intravenosa de acuerdo con las indicaciones de un médico. A modo de orientación, la dosis recomendada de decitabina es de 15 mg/m<sup>2</sup> administrada por infusión intravenosa continua durante 3 h repetidas cada 8 h durante 3 días (etiqueta clínica de decitabina; Fenaux P. (2005) Nature Clinical Practice, 2, S36-44). Este ciclo se repite preferiblemente cada 6 semanas. Los pacientes con tumores sólidos avanzados por lo general reciben una infusión de 72 horas de decitabina a 20-30 mg/m<sup>2</sup>/día.

Alternativamente, la decitabina se puede administrar a una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup> mediante infusión intravenosa continua durante 1 hora repetida diariamente durante 5 días. El ciclo se repite cada 4 semanas (véase la etiqueta del fármaco aprobado por la FDA para la decitabina).

La presente invención se describe adicionalmente a modo de ejemplo, y con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La figura 1 muestra el efecto de la azacitidina en combinación con CNDAC sobre el perfil del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células HL60 después de 72 horas. (A) Las células HL60 se trataron con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido de azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante 48 horas más. Las células se fijaron y el ADN se tiñó con yoduro de propidio. También se incluyeron controles de agente único. (B) Las células HL60 se trataron con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido de azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante 48 horas más. Las células se tiñeron con anexina V que detectaba células apoptóticas y yoduro de propidio para detectar células viables. También se incluyeron controles de agente único. Los datos son el promedio de dos muestras y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

La figura 2 muestra el efecto de la azacitidina en combinación con CNDAC sobre el perfil del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células HL60 después de 96 horas. (A) Las células HL60 se trataron con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido de azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante 72 horas más. Las células se fijaron y el ADN se tiñó con yoduro de propidio. También se incluyeron controles de agente único. (B) Las células HL60 se trataron con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido de azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante 72 horas más. Las células se tiñeron con anexina V que detectaba células apoptóticas y yoduro de propidio para detectar células viables. También se incluyeron controles de agente único. Los datos son el promedio de dos muestras y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

La figura 3 muestra un curso temporal que muestra el efecto de CNDAC y azacitidina solos o en combinación sobre eventos moleculares en células HL60. Las células HL60 se trataron de la siguiente manera: simulacro de tratamiento con DMSO (D); tratado solo con azacitidina (0.5 x IC<sub>50</sub>: 128 nM) (A); tratado con medios durante 24 horas seguido de CNDAC (1x IC<sub>50</sub>: 133 nM) (C); o azacitidina (128 nM) durante 24 h seguido de CNDAC (133 nM) (AC). Las muestras se recogieron en diversos momentos (indicado) después de la adición de CNDAC. Las células se lisaron, se fraccionaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon para detectar PARP escindido (un marcador de apoptosis). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

## Ejemplos

Los ejemplos que incluyen el uso de azacitidina en combinación con CNDAC no forman parte de la invención.

### Materiales y métodos

#### Líneas celulares y reactivos

Las células MV4-11, HL60 y CEM se adquirieron de la ATCC ECACC (Salisbury, Reino Unido). Las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero de ternera fetal (FCS). Las células se mantuvieron a una densidad de entre 0.2x10<sup>6</sup> y 1x10<sup>6</sup> células/ml.

La CNDAC se preparó de acuerdo con la metodología establecida en el documento EP 535231B (Sankyo Company Limited). CYC682 (sapacitabina) se preparó de acuerdo con la metodología descrita en el documento EP 536936B (Sankyo Company Limited). La decacitabina y azacitidina se compraron de Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones madre de todos los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 mM. Todos los reactivos se compraron de Sigma (Poole, Reino Unido) a menos que se indique lo contrario.

#### Ensayos de cultivo celular/citotoxicidad

Para completar los estudios de combinación, se determinaron los efectos citotóxicos de los compuestos individuales. Para establecer la IC<sub>50</sub> de 72 horas para cada compuesto, se llevaron a cabo experimentos en placas de 96 pocillos y las líneas celulares se sembraron a una densidad de 5,000/pocillo para células MV4-11 y HL60 y 6,000/pocillo para

células CCRF-CEM. En cada línea celular, se determinaron los valores de IC<sub>50</sub> de tratamiento de 72 h para cada compuesto usando el ensayo de azul de alamar.

Se preparó una serie de diluciones para cada fármaco en medio. Dos horas después de la siembra, se añadió un volumen igual de cada compuesto al doble de la concentración deseada y se incubó durante 72 horas. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Al final de la incubación, se preparó un stock de 20% de azul de alamar (Roche, Lewes, Reino Unido) en medios, y se añadió un volumen igual a cada pocillo y se incubó durante tres horas. Se leyó la absorbancia a 544-595 nm y se analizaron los datos (Excel Fit v4.0) para determinar la IC<sub>50</sub> (concentración del compuesto que inhibió el crecimiento celular en un 50%) para cada compuesto.

La CNDAC se probó luego en combinación con decitabina o azacitidina usando tres regímenes de tratamiento diferentes: tratamiento previo concomitante con CNDAC seguido de inhibidor de metiltransferasa y tratamiento previo con inhibidor de metiltransferasa seguido de CNDAC.

Protocolo de combinación de fármacos Calcusyn

Los tratamientos combinados se evaluaron de la siguiente manera: se usó un ensayo de citotoxicidad para tratar células con dos fármacos en un intervalo de concentraciones y se analizó usando el modelo de efecto mediano (Chou and Talalay, 1984). Para los ensayos de citotoxicidad, los tratamientos fueron ya sea concomitantes (por ejemplo, análogo de nucleósido + DMTi) o 24 horas de tratamiento previo del análogo de nucleósido seguido de 72 horas con tratamiento concomitante de ambos agentes (análogo de nucleósido - DMTi) y viceversa (DMTi - análogo de nucleósido). Los tratamientos puramente secuenciales no fueron posibles de realizar con líneas celulares en suspensión. La dosificación utilizada se basó en torno a la IC<sub>50</sub> durante 72 horas.

Dado que las células MV4-11, HL60 y CCRF-CEM no se adhieren a las placas de 96 pocillos, no era práctico aspirar el medio de los pocillos, por lo que los compuestos de tratamiento previo no se eliminaron durante los experimentos de combinación. Para el análisis de combinación, se usaron diluciones en serie de 2 veces de cada compuesto, con el intervalo de concentración de los agentes individuales elegidos de modo que abarcara el valor de IC<sub>50</sub> del compuesto. CNDAC, decitabina y azacitidina se disolvieron en DMSO antes de añadir el compuesto a los medios.

Para el tratamiento concomitante, se añadieron diluciones en serie de CNDAC, inhibidor de metiltransferasa, o ambos fármacos simultáneamente a las células 24 h después de la siembra en placas, y se dejaron durante 72 h a 37°C.

En los regímenes de tratamiento previo, el primer fármaco se añadió inmediatamente después de que las células se sembraron en placas, y se dejó durante 24 h. Luego se añadió medio nuevo que contenía el segundo fármaco, y se incubó durante 72 h. Los dos controles para cada tratamiento secuencial implicaron sustituir uno de los tratamientos farmacológicos con medio. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Después del tratamiento farmacológico, se estimó el número de células en cada pocillo incubando las células durante aproximadamente 6 h en medio que contenía azul alamar al 10% (Roche, Lewes, East Sussex, Reino Unido) y leyendo la absorbancia a 544-595 nm. Las interacciones farmacológicas se analizaron usando el paquete de software comercial Calcusyn, que se basa en el modelo de efecto mediano de Chou and Talalay (Chou, T.C. & Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55. Análisis cuantitativo de las relaciones dosis efecto: los efectos combinados de múltiples fármacos o inhibidores enzimáticos). Un índice de combinación (C.I.) de 1 indicaba una interacción aditiva del fármaco, mientras que un C.I. mayor que 1 fue antagónico y un puntaje inferior a 1 fue sinérgico. Las definiciones de los valores de CI son de la siguiente manera: 1.45-1.2 es moderadamente antagónico, 1.2-1.1 es ligeramente antagónico, 1.1-0.9 es aditivo, 0.9-0.85 es ligeramente sinérgico, 0.85-0.7 es moderadamente sinérgico y 0.7-0.3 es sinérgico.

Análisis del ciclo celular

Los tratamientos celulares fueron de la siguiente manera: para la evaluación de un solo agente, las células HL60 se sembraron por triplicado a  $0.3 \times 10^6$  células/ml en medio y se trataron con azacitidina 128 nM ( $0.5 \times IC_{50}$ ) o 133 nM ( $1 \times IC_{50}$ ) CNDAC o DMSO solo durante 48 o 72 horas antes de la cosecha para citometría de flujo. Para el análisis de combinación, las células se trataron con azacitidina durante 24 horas seguidas de otras 48 o 72 horas con azacitidina y CNDAC. Para los controles, también se realizaron tratamientos de agente único para cada fármaco. Al final de la incubación, las células se cosecharon mediante lavado dos veces en PBS y fijación en etanol al 70% y almacenamiento a -20°C. Antes del análisis, las células se lavaron dos veces en PBS que contenía BSA al 1% seguido de tinción con yoduro de propidio (50 µg/ml) y ribonucleasa A (50 µg/ml) en PBS que contenía Triton X-100 al 0.1% y el perfil del ciclo celular fue determinado por citometría de flujo.

Tinción de anexina V

Las células HL60 se pretrataron con azacitidina 128 nM (equivalente a  $0.5 \times IC_{50}$ ) durante 24 horas seguido de un tratamiento concomitante con azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM (equivalente a  $1 \times IC_{50}$ ) durante 48 o 72 horas.

Los tratamientos con un solo agente también se realizaron como controles. Después de la incubación, las células se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos, se lavaron dos veces en PBS y una vez en solución reguladora de anexina (Hepes 10 mM, pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM y NaCl 140 mM). Las células se resuspendieron a 1 x 10<sup>6</sup>/ml y se transfirieron 100 µl a un tubo de 5 ml antes de la incubación durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente con 5 µl de tinción de anexina V-FITC (Beckton Dickinson) y 10 µl de yoduro de propidio [50 mg/ml]. Se añadió solución reguladora de anexina (1 ml) y las células se analizaron por citometría de flujo. Las células positivas para anexina V (apoptóticas) se designaron sobre la base de fluorescencia verde y las células positivas (muerta) para yoduro de propidio se designaron sobre la base de fluorescencia roja.

5

10 Preparación y análisis de lisados celulares por inmunotransferencia.

Las células se sembraron a 0.3 x 10<sup>6</sup> células/ml en matraces T25 y se trataron con ya sea DMSO o azacitidina a 128 nM (equivalente a 0.5 x IC<sub>50</sub>) durante 24 horas seguido de un tratamiento concomitante con azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM (equivalente a 1 x IC<sub>50</sub>) durante otras 24, 36, 40, 48 y 72 horas.

15

Las células se cosecharon por centrifugación a 500 g durante 5 minutos, se lavaron una vez con PBS helado y se resuspendieron en 100 µl de solución reguladora de lisis (HEPES 50 mM, pH 7.0, NaCl 20 mM, DTT 1 mM, 1x inhibidores de proteasa, pirofosfato de sodio 10 mM, NaF 10 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Todas las muestras se lisaron por sonicación (configuración ráfagas de 2 x 3s con Sanyo soniprep 150 a 5 amp). La concentración de proteína de cada lisado se determinó usando el ensayo BCA (Perbio Science, Northumberland, Reino Unido).

20

El lisado (30 µg) se mezcló con solución reguladora de carga de gel que contenía agente reductor y se separó en geles de poliacrilamida al 10% o 12% usando condiciones electroforéticas desnaturalizantes según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Glasgow, Reino Unido). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham, Chalfont St.Giles, Reino Unido) usando transferencia electroforética húmeda.

25

Las membranas se tiñeron con ponceau S para confirmar una carga igual antes de bloquearlas en leche descremada al 5% en PBS con Tween 20 al 0.1% (PBSTM) durante 1 hora. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario, diluido en PBSTM. Los anticuerpos usados en este estudio fueron: PARP escindido (Becton Dickinson). Las membranas se lavaron en PBS y Tween 20 al 0.1% (PBST) y se incubaron durante 1 hora en PBSTM que contenía anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante. Las membranas se lavaron y se incubaron con solución de ECL (Amersham) y se expusieron a una película de rayos X (Amersham).

30

Resultados

35

CNDAC y decitabina en combinación en líneas celulares hematológicas

La CNDAC se probó en combinación con decitabina en las líneas celulares AML HL60 y MV4-11, y las líneas celulares ALL CCRF-CEM usando tres regímenes de tratamiento diferentes. Los valores del índice de combinación de cada tratamiento farmacológico se muestran para los valores de ED50, ED75 y ED90 en la tabla 1 (el punto en la curva donde el 50%, 75% y 90% de las células han sido destruidas). Los datos son el promedio de tres experimentos independientes.

40

Tabla 1:

Línea celular	Efecto	Tratamiento previo con CNDAC	Tratamiento previo con DECITABINA	Concomitante
MV4-11 (N=3)	ED50	0.95	1.17	0.79
	ED75	0.71	0.66	0.88
	ED90	0.59	0.44	1.06
HL60 (N=3)	ED50	1.16	0.6	1.47
	ED75	0.64	0.48	1.1
	ED90	0.68	0.62	1.86
CCRF-CEM (N=3)	ED50	0.58	0.94	1.29
	ED75	0.5	0.68	0.85
	ED90	0.64	0.52	0.85

45

La CNDAC y la decitabina generaron una sinergia moderada a fuerte en las tres líneas celulares analizadas. El tratamiento previo con CNDAC y el tratamiento previo con decitabina fueron ambos regímenes de tratamiento

particularmente efectivos para esta combinación. Estos resultados apoyan la idea de combinar CNDAC con decitabina en líneas celulares hematológicas.

La CNDAC y la azacitidina en combinación en líneas celulares hematológicas

La CNDAC se probó en combinación con azacitidina en las líneas celulares AML HL60 y MV4-11, y la línea celular ALL CCRF-CEM usando tres regímenes de tratamiento diferentes. Los valores del índice de combinación de cada tratamiento farmacológico se muestran para los valores de ED50, ED75 y ED90 en la tabla 2 (el punto en la curva donde el 50%, 75% y 90% de las células han sido destruidas). Los datos son el promedio de tres experimentos independientes.

Tabla 2:

Línea celular	Efecto	Tratamiento previo con CNDAC	Tratamiento previo con azacitidina	Concomitante
MV4-11 (n=3)	ED50	1.23	1.09	1.13
	ED75	0.95	1.04	1.03
	ED90	0.77	1.02	0.96
HL60 (n=3)	ED50	1.33	0.91	1.24
	ED75	1.13	0.6	1.11
	ED90	1.03	0.4	0.99
CCRF-CEM (n=3)	ED50	0.75	0.76	1.02
	ED75	0.71	0.61	1.09
	ED90	0.72	0.51	1.19

La CNDAC y la azacitidina indujeron una sinergia moderada a fuerte en las tres líneas celulares analizadas. El tratamiento previo con azacitidina generó una fuerte sinergia en las células HL60 y CEM, mientras que el tratamiento previo con CNDAC produjo una sinergia moderada en las células MV4-11 y CEM. Estos resultados apoyan la idea de combinar CNDAC con azacitidina en líneas celulares hematológicas.

Análisis del ciclo celular

Las células HL-60 o MV4-11 se trataron con DMSO, CNDAC o azacitidina, como se indica en las figuras 1A y 2A. Las concentraciones del compuesto evaluadas fueron células HL-60 azacitidina  $0.5 \times IC_{50} = 0.13 \mu M$ ; CNDAC  $IC_{50} = 0.13 \mu M$ ; células MV4-11 CNDAC  $IC_{50} = 0.46 \mu M$ . Los perfiles del ciclo celular se analizaron después del tratamiento en las condiciones indicadas.

El tratamiento con azacitidina sola causó una acumulación de células en sub-G1, G2/M, y >G2/M observadas a las 72 y 96 horas de exposición (Figuras 1A y 2A). El tratamiento con CNDAC solo causó una acumulación de células en G2/M por 48 horas con una pequeña inducción de células en sub-G1. La combinación de agentes mostró un pequeño aumento adicional en las células en sub-G1 con poco cambio en las otras fases del ciclo celular en 48 horas. A las 72 horas, un aumento más dramático en sub-G1 que representa el 45% de las células en comparación con el 9% y el 7% para los tratamientos de agente único de azacitidina y CNDAC respectivamente. En conjunto, estos datos sugieren que el tratamiento combinado causa un aumento dependiente del tiempo en la muerte celular mayor que cualquiera de los agentes solos.

Análisis de anexina V

Para evaluar la muerte celular con más detalle, los agentes únicos y los tratamientos combinados de azacitidina y CNDAC en HL60 se midieron con anexina V, un marcador de apoptosis. Las células fueron expuestas a azacitidina (128 nM) durante un total de 96 horas. Para el tratamiento combinado después de 24 horas, se añadió CNDAC (133 nM) durante 72 horas más en presencia de azacitidina. El tratamiento con un agente único con azacitidina causó un pequeño aumento en la proporción de células apoptóticas en 72 y 96 horas (Figuras 1B y 2B). La CNDAC solo mostró poco efecto a las 48 o 72 horas en comparación con los controles (Figura 1B y 2B). La combinación de agentes mostró mayores efectos (66%) que cualquiera de los agentes solos (azacitidina: 30.5% y CNDAC: 16.5%) con la mayor diferencia entre los agentes individuales y la combinación en el punto de tiempo más largo de 96 horas de tratamiento total (Figura 2B).

Experimentos de transferencia Western

Para complementar el análisis del ciclo celular, las células HL60 tratadas con los agentes individuales o con la combinación se evaluaron para la inducción de PARP escindido (un marcador de apoptosis) en un intervalo de puntos de tiempo (Figura 3).

5 Las células HL-60 se trataron con DMSO, azacitidina 0.13  $\mu$ M, CNDAC 0.13  $\mu$ M o ambos agentes (AC). El programa incluyó 24 horas de azacitidina o tratamiento previo con DMSO seguido de la adición de CNDAC o DMSO para los tiempos indicados. Las células se cosecharon después de 48 h-96 h de tiempo total de tratamiento. Los lisados resultantes (20  $\mu$ g) se resolvieron en geles de acrilamida Bis-Tris al 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondearon con los anticuerpos que se muestran en la figura 3. Los resultados mostraron que el  
10 tratamiento con azacitidina sola causó una pequeña inducción en PARP escindido en los puntos de tiempo tempranos. La PARP escindida también se observó en el tratamiento combinado. En puntos de tiempo posteriores, CNDAC también indujo PARP escindido en puntos de tiempo posteriores. El tratamiento con la combinación mostró mayores efectos sobre la PARP escindida que cualquiera de los agentes solos. Los resultados indican que la combinación de CNDAC y azacitidina induce apoptosis pero no modula las proteínas de la familia Bcl-2.

15 Programa de dosificación para la AML

En las líneas celulares de AML, el metabolito activo de sapacitabina, CNDAC, es sinérgico con los agentes hipometilantes y la sinergia es más evidente si las células se tratan primero con agentes hipometilantes.

20 Se llevó a cabo un estudio de fase 1/2 para evaluar la seguridad y eficacia de administrar sapacitabina en ciclos alternos con decitabina en AML de edad avanzada recién diagnosticada. La dosis de decitabina es de 20 mg/m<sup>2</sup> infundidos por vía intravenosa/día x 5 días consecutivos seguidos de 3 semanas de descanso durante el primer y el número impar de ciclos; la dosis de sapacitabina es de 300 mg b.i.d. x 3 días/semana x 2 semanas seguidas de 2  
25 semanas de descanso para el segundo e incluso número de ciclos. Estas dosis se consideran tolerables si se produce DLT en  $\leq 2$  de 6 pacientes en la parte de la fase 1. El tamaño de la muestra para la Fase 2 es de 24 pacientes, incluidos los que recibieron las mismas dosis de ambos medicamentos en la parte de la Fase 1 porque los criterios de elegibilidad son los mismos para ambas partes. El criterio de valoración principal de eficacia es la tasa de respuesta (CR, CRp, PR o HI principal). Un criterio de valoración secundario de eficacia es la mediana de supervivencia global. El régimen se considerará tolerable si se produce toxicidad limitante de la dosis en menos del 33% de los pacientes y la mortalidad a las 8 semanas es inferior al 37%. La mortalidad a las ocho semanas, o tasa de mortalidad, se define como la muerte por cualquier causa que ocurra dentro de los 60 días posteriores a la fecha de registro del paciente en el estudio.

35 Métodos: los pacientes elegibles deben ser  $\geq 70$  años con AML sin tratamiento previo para quienes el tratamiento de elección es la terapia de baja intensidad o el paciente ha rechazado la quimioterapia de inducción estándar; los pacientes que recibieron agentes hipometilantes para MDS o MPD previos están excluidos.

40 Resultados: 25 pacientes fueron tratados con las dosis anteriores de decitabina y sapacitabina y 16 tuvieron  $\geq 60$  días de seguimiento. La mediana de edad es 76 años. No se observaron toxicidades limitantes de la dosis y la tasa de mortalidad a las 8 semanas fue del 12.0%. La tasa de respuesta (CR, CRp, PR o HI mayor) fue del 40%. Tres pacientes lograron CR y 2 pacientes lograron PR y 1 paciente logró HI mayor en plaquetas. El tiempo de respuesta es de 2-4 ciclos. Ocho pacientes han recibido  $\geq 4$  ciclos de tratamiento. Tres pacientes murieron dentro de los 60 días y las muertes no estaban relacionadas con los fármacos del estudio según la evaluación del investigador. Los  
45 eventos adversos comunes (independientemente de la causalidad) incluyeron debilidad, anorexia, náuseas, diarrea, deshidratación, disnea, edema, neumonía, neutropenia febril, neutropenia, trombocitopenia, anemia e hipocalcemia, la mayoría de las cuales fueron de intensidad moderada. Estos datos provisionales sugieren que este régimen de tratamiento es seguro y activo en ancianos con AML.

50 Entre otros 21 pacientes tratados en un estudio clínico separado con un régimen idéntico y al menos 60 días de seguimiento, la tasa de toxicidad limitante de la dosis fue del 9.5% y la tasa de mortalidad a las 8 semanas fue del 14.3%. Como se indicó anteriormente, los pacientes recibieron decitabina intravenosa a 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante cinco días consecutivos de un ciclo de 4 semanas (ciclos impares) y sapacitabina secuencialmente a 300 mg por vía oral dos veces al día, durante tres días a la semana durante dos semanas de un ciclo de 4 semanas (ciclos pares).

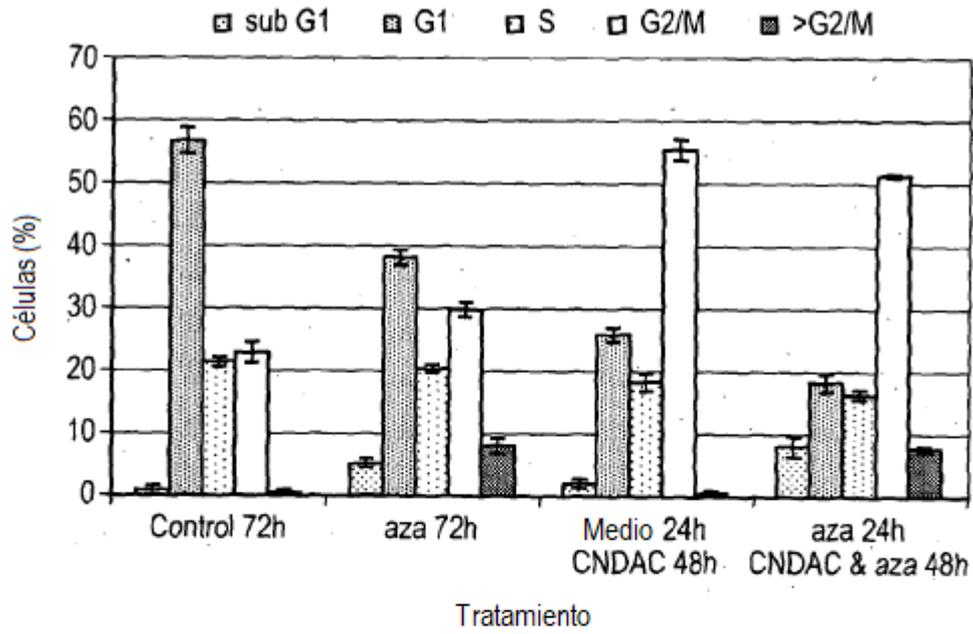
55 La tasa de mortalidad a los 30 días en los 46 pacientes tratados con el régimen fue del 5%.

## REIVINDICACIONES

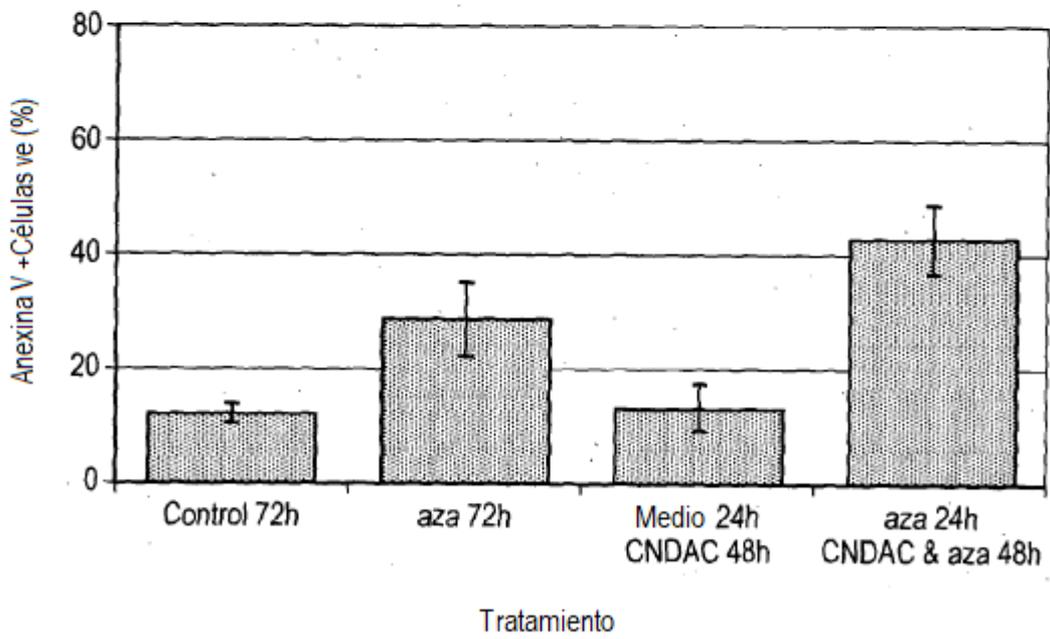
- 5 1. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y la decitabina se administran según un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,
- 10 en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz terapéuticamente de decitabina durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso desde 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y
- 15 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina, o metabolito de la misma, en una dosis de 100 a 400 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso desde 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.
- 20 2. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según la reivindicación 1, en el que el segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina.
- 25 3. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de decitabina durante 5 días seguido de un período de descanso de 3 semanas.
- 30 4. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de sapacitabina o metabolito de la misma durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguido de un período de descanso de 2 semanas.
- 35 5. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquier reivindicación precedente que comprende dos o más de cada ciclo de tratamiento, más preferiblemente, tres o más, cuatro o más, o cinco o más de cada ciclo de tratamiento.
- 40 6. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquier reivindicación precedente que comprende de dos a cuatro de cada ciclo de tratamiento.
- 45 7. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la decitabina se administra por vía intravenosa.
- 50 8. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la decitabina se administra en una dosis de 10 a 20 mg/m<sup>2</sup>.
- 55 9. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la decitabina se administra en una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup> por día.
- 60 10. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sapacitabina o el metabolito de la misma se administra por vía oral.
11. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sapacitabina o el metabolito de la misma se administra en una dosis de 250-300 mg b.i.d.
12. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sapacitabina o el metabolito de la misma se administran en una dosis de 300 mg b.i.d.
13. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un sujeto de edad avanzada, preferiblemente de 65 años de edad o más.
14. (i) Sapacitabina, o un metabolito de la misma que es CNDAC; y (ii) decitabina; para su uso en el tratamiento de AML en un sujeto de edad avanzada, en el que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y decitabina, se administran de acuerdo con un régimen de dosificación que comprende al menos un primer ciclo de tratamiento y al menos un segundo ciclo de tratamiento,

en el que dicho primer ciclo de tratamiento comprende administrar decitabina por vía intravenosa en una dosis de 20 mg/m<sup>2</sup> por día, durante 5 días consecutivos seguido de un período de descanso de 3 a 5 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo; y

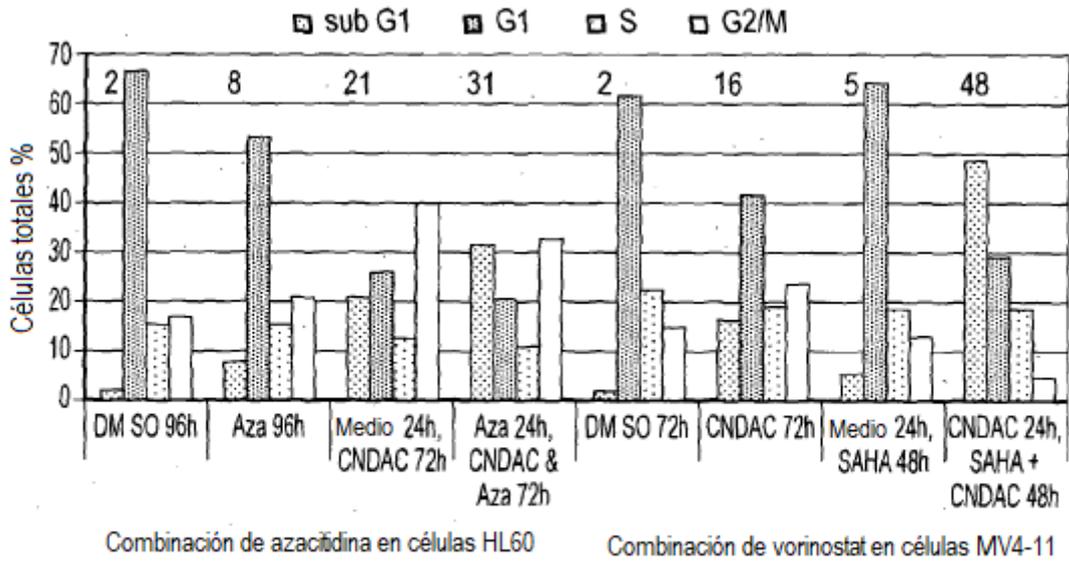
- 5 en el que dicho segundo ciclo de tratamiento comprende administrar sapacitabina o metabolito de la misma por vía oral en una dosis de 300 mg b.i.d., durante 3 días consecutivos por semana, durante 2 semanas seguidas de un período de descanso de 2 a 4 semanas, o hasta que se resuelvan las toxicidades relacionadas con el tratamiento, lo que sea más largo.



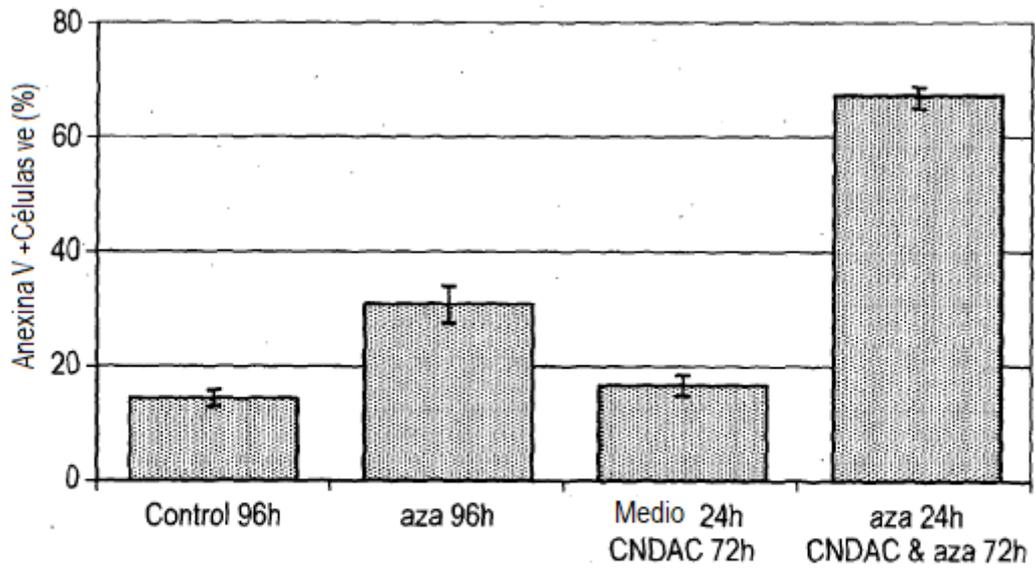
**FIGURA 1A**



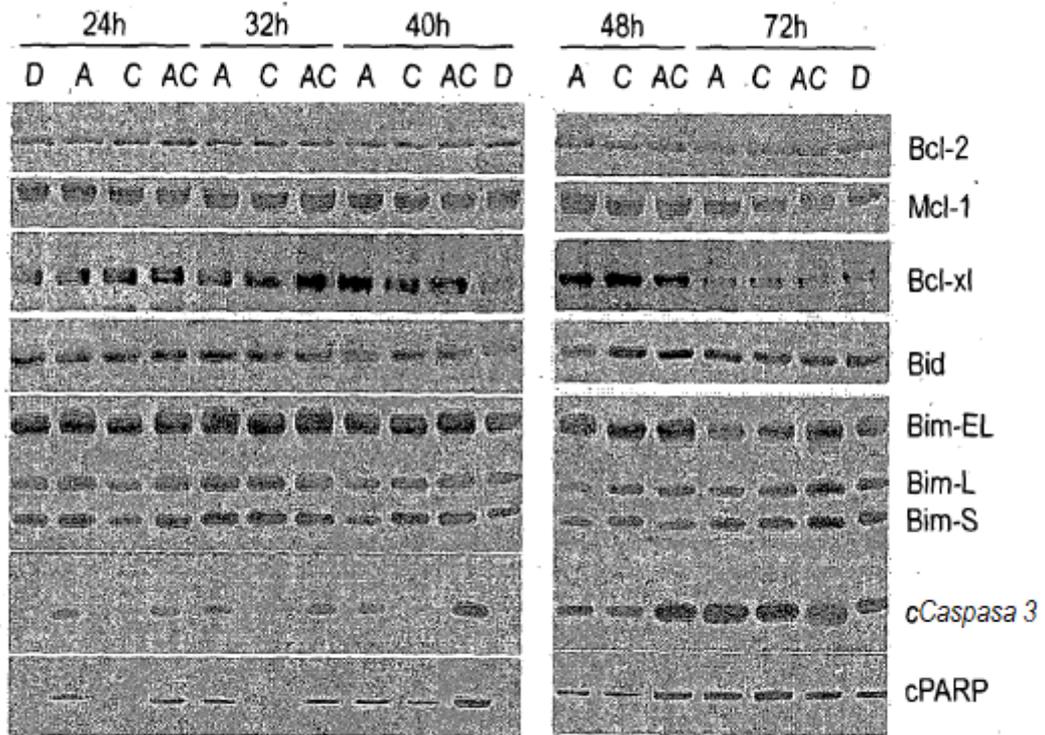
**FIGURA 1B**



**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**



**FIGURA 3**