



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 769 634

(51) Int. Cl.:

A61K 31/215 (2006.01) A61K 31/196 (2006.01) A61K 31/351 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/04 C07C 233/52 C07D 309/30 (2006.01) C07D 317/68 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

04.11.2011 PCT/CA2011/050690 (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional:

(87) Fecha y número de publicación internacional: 10.05.2013 WO13063679

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 04.11.2011 E 11874886 (2)

08.01.2020 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: EP 2773340

(54) Título: Uso de inhibidores de la sialidasa NEU1 en el tratamiento del cáncer

⁽⁴⁵⁾ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 26.06.2020

(73) Titular/es:

SZEWCZUK, MYRON R. (100.0%) 378 Renda Street Kingston, Ontario K7M 5Y1, CA

(72) Inventor/es:

JOSEFOWITZ PAUL ZACHARY y SZEWCZUK MYRON R.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de la sialidasa NEU1 en el tratamiento del cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo del tratamiento del cáncer y en particular a fosfato de oseltamivir para su uso en el tratamiento del cáncer y en particular cáncer pancreático.

10 Antecedentes de la invención

Fosfato de oseltamivir

El fosfato de oseltamivir (comercializado por Hoffman la Roche con el nombre comercial Tamiflu) es la forma de profármaco del conocido inhibidor de la neuraminidasa viral carboxilato de oseltamivir, que se usa en el tratamiento y la profilaxis de la gripe y otros virus similares. El fosfato de oseltamivir no es eficaz por sí mismo como un antiviral; es el profármaco del éster etílico del agente antiviral activo carboxilato de oseltamivir. El fosfato de oseltamivir que se administra por vía oral para su uso como un antiviral es metabolizado en el hígado por la enzima carboxiesterasa en la forma antiviral activa. Oseltamivir es un inhibidor competitivo de ácido siálico encontrado en las proteínas de la superficie de células hospedadoras normales. El agente antiviral funciona bloqueando la actividad de la enzima neuraminidasa viral, previniendo que nuevas partículas virales sean liberadas por células infectadas.

Se han descrito métodos de preparación de oseltamivir y derivados o análogos del mismo en la bibliografía de patentes, por ejemplo, en las publicaciones PCT WO 2009/137916 (en lo sucesivo '916) a Hudlicky et al. [1] y WO 2011/047466 (en lo sucesivo '466) a Hudlicky et al. [2]]. Las publicaciones de patente '916 y '466 describen además productos intermedios útiles para el proceso de preparación de oseltamivir y derivados del mismo.

Tratamiento del cáncer

25

35

40

45

30 En todo el mundo, millones de personas mueren de cáncer cada año. La Sociedad Estadounidense del Cáncer informa que la mitad de los hombres y un tercio de todas las mujeres en los Estados Unidos desarrollarán cáncer durante sus vidas. Hoy en día, millones de personas están viviendo con cáncer o han tenido cáncer. El estudio de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) del Instituto Nacional del Cáncer estadounidense estimó la prevalencia del cáncer en los Estados Unidos en 2007 en 11.714.000.

Los carcinomas de pulmón, próstata, mama, colon, páncreas y ovario tienen una alta incidencia de muerte por cáncer, especialmente si el cáncer se encuentra en la etapa de progresión final. Estos y prácticamente todos los otros carcinomas pueden conducir además a una enfermedad metastásica que en muchos casos es mortal. Además, incluso para los pacientes con cáncer que sobreviven inicialmente a sus cánceres primarios, todavía existe un riesgo de reaparición.

En particular, los pacientes con cáncer pancreático frecuentemente presentan enfermedad avanzada que es mortal y difícil de tratar. A pesar del uso rutinario de quimioterapia y radioterapia, la tasa de supervivencia de pacientes con cáncer pancreático avanzado no ha mejorado espectacularmente. La quimioterapia y la radioterapia proporcionan poco o ningún beneficio. Estos resultados demandan una necesidad urgente de novedosos enfoques terapéuticos. Por consiguiente, el desarrollo de novedosas estrategias de tratamiento del cáncer es críticamente esencial para mejorar la gestión clínica y el pronóstico de pacientes con cáncer y en particular pacientes con cáncer pancreático.

La investigación en el campo del tratamiento del cáncer ha buscado formas para modular vías celulares que son esenciales para que el cáncer sobreviva y crezca. Numerosos receptores y vías moleculares participan en la oncogénesis y el crecimiento y la proliferación del cáncer, que incluyen Ras, EGFR, VEGF, gastrina y metaloproteinasas de la matriz.

- El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; ErbB-1; HER1 en seres humanos) es el receptor del miembro de la superficie celular del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF) de ligandos de proteína extracelular. El EGFR es un miembro de la familia de receptores de ErbB, una subfamilia de cuatro tirosina cinasas de receptor estrechamente relacionadas: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y HER 4 (ErbB-4). Las mutaciones que afectan la expresión o actividad de EGFR podrían dar como resultado cáncer.
- 60 La subfamilia de Ras (una abreviatura de sarcoma de rata) es una subfamilia de proteínas de GTPasas pequeñas que participan en la transducción de señales celulares. La activación de la señalización de Ras provoca el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular.
- Todos los miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) estimulan respuestas celulares por unión a receptores de tirosina cinasa (los VEGFRs) sobre la superficie celular, causando que dimericen y se activen mediante autofosforilación. El VEGF es una proteína señal producida por células que estimulan la

vasculogénesis y la angiogénesis.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

65

En seres humanos, la gastrina es una hormona que estimula la secreción de ácido gástrico (HCI) por las células parietales del estómago y ayuda en la motilidad gástrica. Se libera por células G en el estómago, duodeno, y el páncreas. Su liberación se estimula por péptidos en la luz del estómago.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son endopeptidasas dependientes de cinc, así como adamalisinas, serralisinas y astacinas. Las MMPs pertenecen a una familia más grande de proteasas conocida como la superfamilia de las metzincinas. Son capaces de degradar todos los tipos de proteínas de la matriz extracelular, pero también pueden procesar varias moléculas bioactivas. También se conocen por estar implicadas en la escisión de receptores de la superficie celular, la liberación de ligandos apoptósicos (tales como el ligando FAS), y la inactivación de quimiocinas/citocinas [3].

Aunque las vías de señalización de muchos receptores glicosilados que incluyen EGFR, VEGF, insulina y otros que participan en el cáncer están todas bien caracterizadas, los parámetros que controlan las interacciones entre estos receptores y sus ligandos siguen estando poco definidos. Se ha identificado un paradigma de señalización novedoso de la activación de receptores glicosilados por sus ligandos naturales [4-7].

Receptor de tipo Toll (TLR)

Se ha desvelado que la activación del receptor de tipo TOLL inducido por ligando (TLR) está controlada por la activación de la sialidasa Neu1. Los estudios han mostrado que Neu1 ya está en complejo con los receptores de tipo TOLL, y la activación se induce después de la unión a ligando de los ligandos naturales a sus receptores respectivos. Además, Neu1 activado hidroliza específicamente restos de α -2,3-sialilo unidos a β -galactósido, que están alejados del sitio de unión del ligando. Esto elimina el impedimento estérico para la dimerización del receptor, y conduce a las posteriores vías de señalización [4, 6].

Se ha encontrado que el inhibidor de la neuraminidasa, fosfato de oseltamivir, inhibe específicamente la actividad de Neu1 inducida por TLR sobre la superficie celular de células de macrófagos y dendríticas, y posteriormente bloquea la activación de NFkB inducida por el ligando de TLR, la producción de óxido nítrico (NO) y citocinas pro-inflamatorias [4]. Además, otros inhibidores de la neuraminidasa purificados tales como BCX-1827, DANA (ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico), zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en) y carboxilato de oseltamivir tuvieron un efecto limitado sobre la inhibición de la actividad de la sialidasa inducida por lipopolisacárido (LPS) en células vivas de macrófagos BMC-2 a 1-2 mM en comparación con el control positivo de LPS.

Otros estudios usando sialidasas humanas solubles recombinantes han mostrado que el carboxilato de oseltamivir apenas inhibió las actividades de las cuatro sialidasas humanas incluso a 1 mM [8], mientras que zanamivir inhibió significativamente las sialidasas humanas Neu2 y Neu3 en el intervalo micromolar. Además, Nan *et al.* usando lisados de células dendríticas maduras han encontrado que zanamivir inhibió completamente la actividad de las sialidasas Neu1 y Neu3 a 2 mM [9].

Se ha encontrado de forma interesante que el fosfato de oseltamivir era el más potente en comparación con los otros inhibidores de la neuraminidasa en la inhibición de la actividad de sialidasa asociada a células de macrófagos vivos tratados con ligando de TLR, mientras que este compuesto se conoce por ser ineficaz como un antiviral *in vitro* debido a que su actividad antiviral se logra por su metabolito hidrolítico carboxilato de oseltamivir [10].

Para elucidar más la capacidad inhibidora del fosfato de oseltamivir y su metabolito hidrolítico el carboxilato de oseltamivir, se determinó la concentración inhibidora a 50 % (CI50) de cada compuesto representando la disminución en la actividad de sialidasa frente al logaritmo de la concentración de agente. Se mostró que el fosfato de oseltamivir tenía una CI50 de 1,175 μM en comparación con una CI50 de 1015 μM para el carboxilato de oseltamivir [4]. Estos datos ilustran claramente que el fosfato de oseltamivir es 1000 veces más potente que su metabolito hidrolítico en inhibir la actividad de la sialidasa asociada a células de macrófagos BMC-2 vivas tratadas con ligando de TLR.

Es posible que el fosfato de oseltamivir se pudiera transportar a través de la membrana celular por una P-glucoproteína como se describe por Morimoto *et al.* [11], donde la activación hidrolítica se podría catalizar por carboxilesterasa [10]. Se ha determinado previamente que el agente antiplaquetario clopidogrel inhibe la hidrólisis del fosfato de oseltamivir por carboxilesterasa en más de 90 % [10]. Para determinar si el fosfato de oseltamivir se hidroliza en la célula en este sistema de ensayo de células vivas, las células vivas de macrófagos de BMA se pretrataron con bisulfato de clopidogrel a 280 μM y 500 μM durante 2 min, seguido con 5 μg/ml de lipopolisacárido de endotoxina (LPS) en presencia o ausencia de fosfato de oseltamivir puro 400 μM. Los resultados indicaron que el agente anticarboxilesterasa clopidogrel no tuvo efecto sobre la capacidad del fosfato de oseltamivir para inhibir la actividad de la sialidasa inducida por LPS [4]. Juntos, estos resultados sugieren que el fosfato de oseltamivir es un potente inhibidor de la sialidasa asociado a células de macrófago vivas tratadas con ligando de TLR.

Receptor de tirosina cinasa (Trk)

Se ha estudiado la función de la sialidasa Neu1 como enlace intermedio en el proceso inicial de activación del receptor de tirosina cinasa inducida por ligando (Trk) y la posterior función celular [12]. Se informa que Neu1 forma un complejo con receptores glicosilados de Trk dentro del ectodominio [12], que está de acuerdo con los resultados previos informados con receptores de TLR [13,14].

Se ha mostrado que Neu1 es un producto intermedio requerido en la regulación de la activación de Trk tras la unión de neurotrofina al receptor. Además, basándose en hallazgos previos, se predice que Neu1, activado por la unión de neurotrofina al receptor, dará como resultado una rápida retirada de restos de α-2,3-sialilo unidos a β-galactósidos sobre el ectodominio de Trk para generar un receptor funcional de Trk [12]. Aunque existen cuatro sialidasas de mamífero identificadas clasificadas según su localización subcelular [15], las sialidasas clasificadas como citosólicas (Neu2), unidas a la membrana plasmática (Neu3) [16-18] y Neu4 [19,20], no participan en la actividad de la sialidasa asociada a células vivas que expresan Trk tratadas con neurotrofina y neuronas corticales primarias. Además, la potenciación de la señalización de GPCR por direccionamiento de membrana de las proteínas de la subunidad Gαi y la activación de la metaloproteinasa-9 de matriz por la unión de ligando al receptor participa en el proceso de activación de la sialidasa Neu1 sobre la superficie celular [12].

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Se encontró que el fosfato de oseltamivir era altamente potente (CI50 3,876 μM) en inhibir la actividad de Neu1 inducida por el tratamiento de NGF de células vivas que expresan TrkA. Los otros inhibidores de la neuraminidasa carboxilato de oseltamivir y zanamivir tuvieron un efecto inhibidor limitado sobre la actividad de la sialidasa Neu1 asociada a las células vivas que expresan TrkA tratadas con NGF. Se especula que el motivo para la potencia inhibidora del fosfato de oseltamivir sobre la actividad de la sialidasa Neu1 puede ser debido a una orientación única de Neu1 con el complejo multienzimático molecular que contiene β-galactosidasa y catepsina A [21] y proteína de unión a elastina (EBP) [22], cuyo complejo se asociaría dentro del ectodominio de receptores de Trk. Otra posibilidad puede implicar el efecto directo del fosfato de oseltamivir sobre la sialidasa Neu1 con especificidad por restos de sialilo α-2,3 unidos a enlace β-galactosilo de receptores TLR. Se ha informado que la desialilación de Neu1 de restos de α-2,3-sialilo de receptores TLR permite la dimerización de receptores [14]. Los datos indicaron que las respuestas de NPκB inducidas por ligando de TLR no se observaron en células HEK293 deficientes en TLR, sino que se restablecieron en células HEK293 establemente transfectadas con TLR4/MD2, y se inhibieron significativamente por lectina de *Maackia amurensis* (MAL-2) específica de α-2,3-sialilo, galectina-1 específica de α-2,3-sialilo y el inhibidor de neuraminidasa fosfato de oseltamivir, pero no por lectina de *Sambucus nigra* (SNA) específica de α-2,6-sialilo.

Conjuntamente, estos hallazgos sugieren que la sialidasa Neu1 es uno de los reguladores clave de la activación de Trk inducida por neurotrofina para generar un receptor funcional. Cabría esperar que el direccionamiento de Neu1 fuera un inhibidor clave de la señalización bloqueando la activación de NGF de la vía de transducción de señales TrkA al nivel de receptor sobre la superficie celular.

En otros estudios, se mostró que la expresión de TrkA y la actividad de cinasas en líneas celulares pancreáticas humanas PANC-1, MIA-PaCa-2 y APC-1 se correlacionaban directamente con quimiorresistencia a gemcitabina. Se ha mostrado además que el silenciamiento de la interferencia por ARN (ARNip) suprimió la expresión de TrkA y la actividad de cinasas y además incrementó la apoptosis mediada por caspasa inducida por gemcitabina [23].

En otros estudios, se encontró que Neu1 regula negativamente la exocitosis lisosómica en células hematopoyéticas donde procesa los ácidos siálicos sobre la proteína de la membrana lisosómica LAMP-1 [24]. Sobre la superficie celular, Seyrantepe *et al.* han mostrado que Neu1 puede activar realmente la fagocitosis en macrófagos y células dendríticas mediante la desialilación de receptores superficiales, que incluyen receptores de Fc para inmunoglobulina G (FcyR) [25]. Stomatos y colaboradores también han mostrado que Neu1 sobre la superficie celular está fuertemente asociado a una subunidad de catepsina A y el complejo resultante influye en el ácido siálico de la superficie celular en células activadas y la producción de IFNγ [9]. Usando ratones deficientes en Neu1, produjeron notablemente menos anticuerpos IgE e IgG1 tras la inmunización con antígenos de proteína, que puede ser el resultado de su fracaso para producir la citocina IL-4 [26].

El entender la activación de EGFR inducida por ligando tiene una enorme relevancia en los campos de la biología del cáncer y la terapéutica. La expresión en exceso de EGFR está frecuentemente implicada en la oncogénesis, donde los efectos antiapoptósicos y pro-crecimiento aguas debajo de la señalización de EGFR actúan para reforzar más las estrategias de una célula cancerosa para sobrevivir y multiplicarse. Como tal, el análisis de la expresión de EGFR y la señalización se incorpora frecuentemente en la gestión clínica de la oncogénesis. Por ejemplo, la expresión en exceso de EGFR se usa rutinariamente como un biomarcador en el análisis de tumores de mama de tipo basal, donde actúa de factor pronóstico de mal pronóstico y una alta tasa de recaída y metástasis [27].

Además, la presencia de mutantes de EGFR sobre la superficie de una célula también puede tener efectos graves y negativos sobre la supervivencia de la célula cancerosa. Uno de los principales mutantes de EGFR implicados en una matriz de tumores es el mutante EGFRVIII, que contiene una deleción de 267 aminoácidos en el dominio extracelular del receptor, que incluye 4 sitios de N-glucosilación [5,28,29]. Los problemas con este receptor proceden del hecho de que sigue constitutivamente activo en todo momento, enviando una corriente continua de señales de pro-crecimiento y división para la célula cancerosa.

Los novedosos terapéuticos del cáncer se han basado en este conocimiento y función para inhibir el EGFR con la esperanza de apagar sus aberrantes vías de señalización. Existen dos formas principales de terapéuticos que dirigen el mecanismo de activación de EGFR: el primero implica la administración de anticuerpos de alta afinidad (es decir, cetuximab) para unir competitivamente al sitio de unión a ligando, previniendo así la unión del ligando, y el segundo implica la administración de inhibidores de molécula pequeña (es decir, erlotinib, gefinitib) que se unen a la porción de tirosina cinasas del receptor e inhiben su actividad de fosforilación [30].

La línea celular PANC-1, una línea celular derivada de carcinoma humano del epitelio ductal pancreático, se usó en un experimento de determinación de si la sialidasa Neu1 también estaba desempeñando una función en la activación de EGFR dentro de un modelo de cáncer pancreático humano. Los mismos resultados en esta línea celular de PANC-1 se observaron como se observaron previamente en la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3-hEGFR en la que la estimulación de EGF del EGFR induce rápidamente la actividad de la sialidasa Neu1. Por tanto, se propone que la sialidasa Neu1 es esencial para el mecanismo de activación de EGFR inducido por ligando y la inhibición de la sialidasa Neu1 inhibirá EGFR [32].

Sumario de la invención

5

10

15

25

30

35

45

50

Se ha encontrado que el fosfato de oseltamivir es un inhibidor de la sialidasa Neu1 y se ha encontrado además que la sialidasa Neu1 actúa mediante una vía de señalización al nivel de receptor, sobre la superficie celular para modular varios otros receptores. EGFR y Trk A están entre los receptores que se encontró que estaban modulados por Neu1 sialidasa; estos receptores se conocen por desempeñar una función en el cáncer.

Se ha encontrado que el fosfato de oseltamivir es un agente antineoplásico eficaz en estudios *in vitro* e *in vivo*. Se ha mostrado que el fosfato de oseltamivir es un agente antineoplásico activo contra una variedad de tipos de células cancerosas *in vitro*.

Se ha encontrado además que el fosfato de oseltamivir en combinación con agentes quimioterapéuticos puede mejorar la eficacia del agente quimioterapéutico y puede mejorar la actividad antineoplásica en células que son resistentes al tratamiento quimioterapéutico convencional.

La presente invención proporciona fosfato de oseltamivir para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención también incluye fosfato de oseltamivir para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde uno o más agentes quimioterapéuticos y dicho fosfato de oseltamivir se administran simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

Se ha encontrado que los análogos de fosfato de oseltamivir pueden actuar de inhibidores de la sialidasa Neu1. También se ha encontrado que dichos análogos actúan de agentes antineoplásicos contra células cancerosas *in vitro*.

40 La presente invención se refiere además a un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el inhibidor de la sialidasa Neu1 es fosfato de oseltamivir, ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-Nacetilneuramínico (DANA), o un análogo de DANA de la fórmula G

en donde R^{50} es alquilo C_{1-6} en donde el alquilo puede ser alifático lineal o ramificada o el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo cíclico.

En un aspecto particular de la invención, el inhibidor de la sialidasa Neu1 es fosfato de oseltamivir.

Preferentemente, el análogo de DANA es

En un aspecto adicional, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende fosfato de oseltamivir en una formulación que es adecuada para inyección y que comprende además uno o más agentes quimioterapéuticos antineoplásicos.

En un aspecto adicional de la presente invención se incluye una composición farmacéutica que comprende fosfato de oseltamivir, DANA o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente y que comprende además uno o más compuestos quimioterapéuticos antineoplásicos.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, solo se dan a modo de ilustración.

20 Breve descripción de los dibujos

15

30

35

40

La Figura 1 es un esquema que representa la vía de señalización del receptor de la superficie celular modulada por la sialidasa Neu1.

La Figura 2a muestras las tasas de supervivencia de ratones de doble mutante RAG2/Cy implantados con células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP tras el tratamiento intraperitoneal con diferentes dosificaciones de fosfato de oseltamivir soluble. Las curvas de supervivencia son significativamente diferentes (*p* =0,0115) según la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox).

La Figura 2b muestra gráficos que indican los pesos de tumores (gráfico izquierdo día 48 y gráfico derecho día 61) para el tratamiento con diferentes concentraciones de fosfato de oseltamivir.

La Figura 3a muestra los pesos tumorales derivados de ratones de doble mutante RAG2/Cy en el día 48 después de la implantación con células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP a continuación del tratamiento intraperitoneal con diferentes dosificaciones de fosfato de oseltamivir soluble.

La Figura 3b muestra imágenes tumorales en el día 46 de ratones de doble mutante RAG2/Cy implantados con células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP tras el tratamiento intraperitoneal con fosfato de oseltamivir soluble.

La Figura 3c muestra imágenes fluorescentes de células antes de la implantación usando un microscopio de fluorescencia Zeiss M2.

La Figura 4a muestra las tasas de supervivencia de ratones de doble mutante RAG2/Cy implantados con células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP tras el co-tratamiento intraperitoneal con fosfato de oseltamivir soluble diariamente y Alimta o Abraxane una vez. Las curvas de supervivencia son significativamente diferentes (p < 0,0001) según la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox).

La Figura 4b es un gráfico que indica el peso tumoral para el tratamiento con Alimta o Abraxane solos en comparación con el co-tratamiento con fosfato de oseltamivir.

Figura 5 Imágenes biofotónicas de tumor, bazo, hígado, pulmones, corazón tomadas de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy. Las células MiaPaCa-2-eGFP fluorescentes en los tejidos se indican por color negro.

Figura 6 Tasas de supervivencia de ratones de doble mutante RAG2/Cy implantados con células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP tras el co-tratamiento intraperitoneal con fosfato de oseltamivir soluble diariamente y tamoxifeno. Las curvas de supervivencia son significativamente diferentes (p < 0.0234) según la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox).

Figura 7 Tasas de supervivencia de ratones NOD de doble mutante RAG1/Cy implantados con células de cáncer pancreático humano PANC-1 tras el co-tratamiento intraperitoneal con fosfato de oseltamivir soluble diariamente y quimioterapéuticos indicados. Las curvas de supervivencia son significativamente diferentes según la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) del siguiente modo:

- (a) Control frente a fosfato de oseltamivir 2 y 5 mg/kg (p < 0.0001)
- (b) Control frente a Abraxane (p < 0.09, no significativo)
- (c) Control frente a Abraxane, fosfato de oseltamivir 2 y 5 mg/kg (p < 0.0009)
- (d) Control frente a gemcitabina, fosfato de oseltamivir 2 y 5 mg/kg (p < 0.0001)

Descripción detallada de la invención

5

10

15

20

25

55

60

65

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos se usan como se definen a continuación, a menos que se indique lo contrario:

30 "Agente anticancerígeno", "agente quimioterapéutico" y "agente antineoplásico" tienen el mismo significado, y estos términos representan los fármacos (medicamentos) usados para tratar el cáncer.

"Al menos uno" significa uno o más de uno, por ejemplo, 1, 2 o 3, o 1 o 2, o 1.

"Simultáneamente" representa (1) simultáneamente en el tiempo (por ejemplo, al mismo tiempo); o (2) en diferentes momentos durante el transcurso de un programa de tratamiento común.

"Consecutivamente" significa uno después del otro.

"Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se indica para describir una cantidad de compuesto o una composición de la presente invención eficaz en inhibir o tratar el cáncer. Por ejemplo, la cantidad del compuesto o composición que resulta en: (a) la reducción, alivio o desaparición de uno o más síntomas provocados por el cáncer, (b) la reducción del tamaño tumoral, (c) la eliminación del tumor, (d) la estabilización de la enfermedad a largo plazo (reducción del crecimiento o parada del crecimiento) del tumor y/o (e) prevención o reducción de metástasis.

"Uno o más" significa al menos uno, por ejemplo, 1, 2 o 3, 1 o 2, o 1.

"Paciente" incluye seres humanos y animales (preferentemente, seres humanos).

"Profármaco" representa compuestos que se transforman, in vivo, en el compuesto activo o en una sal y/o en un solvato del mismo. Las formas de profármaco serían conocidas por un experto en la técnica como se enseña en T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 de A.C.S. Symposium Series, y en Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

"Secuencialmente" significa (1) administración de un componente del método ((a) compuesto de la invención, o (b) agente quimioterapéutico) seguido por la administración del otro componente o componentes; después de la administración de un componente, el siguiente componente se puede administrar sustancialmente inmediatamente después del primer componente, o el siguiente componente se puede administrar después de un periodo de tiempo eficaz después del primer componente; el periodo de tiempo eficaz es la cantidad de tiempo dada para la realización del máximo beneficio de la administración del primer componente.

"Solvato" significa una asociación física de un compuesto con una o más moléculas de disolvente; esta asociación física implica grados variables de enlace iónico y covalente, que incluyen enlace de hidrógeno; en ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo, cuando se incorporan una o más moléculas de disolvente en la red cristalina del sólido cristalino; "solvato" engloba tanto solvatos en fase de disolución como aislables; los ejemplos no

limitantes de solvatos adecuados incluyen etanolatos, metanolatos, y similares; "hidrato" es un solvato en donde la molécula de disolvente es agua.

- "Composición farmacéutica" pretende englobar tanto la composición a granel como unidades de dosificación individuales comprendidas en uno o más (por ejemplo, dos) agentes farmacéuticamente activos tales como, por ejemplo, un compuesto de la presente invención y un agente adicional, tal como un agente quimioterapéutico, junto con cualquier vehículo farmacéuticamente adecuado. La composición a granel y cada unidad de dosificación individual pueden contener cantidades fijas de los uno o más agentes farmacéuticamente activos anteriormente mencionados. La composición a granel es material que todavía no se ha conformado en unidades de dosificación individuales. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, píldoras y similares. Similarmente, el método de tratamiento descrito en el presente documento de un paciente que se administra con una composición farmacéutica de la presente invención también pretende englobar la administración de la composición a granel anteriormente dicha o unidades de dosificación individuales.
- "Sujeto" pretende incluir animales, que son capaces de padecer o sufrir una enfermedad desvelada en el presente documento (por ejemplo, cáncer). Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas, y animales no humanos transgénicos. En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano, por ejemplo, un humano que padece, está en riesgo de padecer, o es potencialmente capaz de padecer cáncer.
 - "Vehículo" se refiere a, por ejemplo, un diluyente, adyuvante, excipiente, agente auxiliar o vehículo que se puede combinar con un agente activo de la presente invención. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", o "vehículo farmacéuticamente adecuado" se refiere a un vehículo adecuado para administración a un sujeto.
- Por ejemplo, los vehículos farmacéuticos adecuados para inyección pueden incluir, pero no se limitan a, líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Preferentemente se emplean agua o disoluciones salinas acuosas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.
 - "Tratamiento" significa un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, reducción del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, reducción de la repetición de la enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada, si no se recibe tratamiento.
- "Análogo", como en "análogo de oseltamivir", se refiere a un análogo de oseltamivir que es un inhibidor de Neu1 y se refiere además a un análogo que es eficaz como agente anticancerígeno. Dichos análogos pueden incluir derivados de oseltamivir o productos intermedios útiles para la preparación de oseltamivir. La invención solo engloba fosfato de oseltamivir, ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (DANA), o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente.

45 Usos médicos

5

10

20

35

50

55

60

Según un aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el inhibidor de la sialidasa Neu1 es fosfato de oseltamivir, ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (DANA), o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente. El tratamiento del cáncer puede incluir el tratamiento del crecimiento del cáncer, progresión, o metástasis, por ejemplo inhibir o tratar el crecimiento de tumores.

- Los ejemplos de enfermedades proliferativas (es decir, cánceres) que se pueden inhibir o tratar incluyen, pero no se limitan a: cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón y cáncer de pulmón de células no pequeñas); cánceres pancreáticos (por ejemplo, carcinoma pancreático tal como, por ejemplo, carcinoma pancreático exocrino); cánceres de estómago, cánceres de esófago, cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon); leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML) y leucemia mielomonocítica crónica (CMML); cáncer folicular de tiroides; síndrome mielodisplásico (MDS); carcinoma de vejiga; carcinoma epidérmico; melanoma; cáncer de mama; cáncer de próstata; cánceres de cabeza y cuello (por ejemplo, cáncer de células escamosas de la cabeza y el cuello); cáncer de ovario; cánceres cerebrales (por ejemplo, gliomas); cánceres de origen mesenquimatoso (por ejemplo, fibrosarcomas y rabdomiosarcomas, sarcomas; tetracarcinomas; neuroblastomas); cáncer de huesos, carcinomas renales; hepatomas; linfoma no Hodgkin; mieloma múltiple); y carcinoma tiroideo anaplásico.
- Por ejemplo, las realizaciones de la presente invención incluyen usos médicos para tratar el cáncer, en donde dicho cáncer es: cánceres pancreáticos, cánceres de estómago, cánceres de estófago, cánceres de pulmón, leucemias

mieloides, tumores foliculares de tiroides, síndrome mielodisplásico, cánceres de cabeza y cuello, melanomas, cánceres de mama, cánceres de próstata, cánceres de ovario, cánceres de vejiga, gliomas, cánceres epidérmicos, cánceres de colon, linfomas no Hodgkin, o mielomas múltiples.

5 En realizaciones particulares, el fosfato de oseltamivir se puede usar para tratar cáncer pancreático, cáncer de mama, o cáncer de ovario en un sujeto en necesidad del mismo.

En una realización particular, el sujeto es un mamífero; en una realización adicional el sujeto es humano.

10 Los cánceres pueden ser cánceres resistentes.

El término resistente describe una enfermedad o afección que no responde al tratamiento. En particular, el cáncer resistente puede ser un cáncer que es o se ha vuelto resistente a fármacos.

La sialidasa Neu1, una enzima que escinde ácidos siálicos unidos en α-2,3 de las moléculas celulares glicosiladas, participa como mediador crítico de TrkA y TrkB y la activación de receptores tras la unión del ligando al receptor en tanto neuronas primarias vivas como líneas celulares que expresan TrkA/B. Los estudios sugieren que una vez el ligando se une al receptor de Trk, la sialidasa Neu1 se activa por una vía mediada por GPCR y metaloproteinasa de la matriz (MMP). Tras la activación de las funciones de la sialidasa para desialilar el receptor externo, esto conduce a la dimerización, y así a la activación del receptor y posterior señalización, como se representa en la Figura 1.

Se ha encontrado además que el receptor de Trk A y EGFR se activan mediante un paradigma de señalización de membranas correspondiente. Se cree que la inhibición de la sialidasa Neu1 inhibe esta vía, inhibiendo así la actividad de al menos estos receptores.

Dado que se ha mostrado que la desialilación del receptor por Neu1 es una etapa importante en TrkA [12], la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina [29], y la activación y señalización de receptores de factores de crecimiento epidérmicos, la sialidasa Neu1 puede de hecho actuar de enzima común maestra en la activación de todos los receptores de RTK.

Aunque no se desea quedar ligado a teoría, se cree que el fosfato de oseltamivir que actúa de inhibidor de la sialidasa Neu1 inhibe la vía de señalización para activar receptores que incluyen el receptor TrkA y EGFR que se conoce que desempeñan una función en el crecimiento y la proliferación de cáncer. El uso de fosfato de oseltamivir para inhibir la sialidasa Neu1 y así inhibir la vía de señalización para activar receptores tales como Trk A y EGFR se puede aplicar como un tratamiento de enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Sin desear quedar ligado a teoría, se cree que el fosfato de oseltamivir puede funcionar mediante la inhibición de la sialidasa Neu1 para inhibir la vía que modula varios receptores y las vías aguas abajo de los receptores que participan en el crecimiento y/o proliferación del cáncer.

Análogos de oseltamivir

En otra realización de la invención, se ha encontrado que los análogos de oseltamivir actúan de inhibidores de la sialidasa Neu1 inhibiendo así la vía de señalización en un modo correspondiente a fosfato de oseltamivir. También se ha encontrado que estos análogos de oseltamivir muestran actividad como agentes antineoplásicos en estudios in vitro. Por consiguiente, una realización de la invención se refiere a un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el inhibidor de la sialidasa Neu1 es ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (DANA), o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente.

Los derivados de fosfato de oseltamivir y los productos intermedios para la preparación de fosfato de oseltamivir se desvelan en las solicitudes PCT publicadas WO2009/137916 y WO2011/047466.

Se desvela un análogo de oseltamivir que es un compuesto según una cualquiera de las fórmulas A-F:

$$R^{1}$$
 R^{2}
 R^{5}
 R^{3}
 R^{4}
Fórmula A

55

25

30

35

40

45

en donde, R¹ es halógeno o COOR⁶; R² es OH u OR⁷;

R3 es OH, OR8 o N3;

R4 es H o acilo C1-6;

R⁵ es O-alquilo C₁₋₆, S-alquilo C₁₋₆, OH, SH, halógeno, N₃, NH₂, NH-alquilo C₁₋₆ o NHPG⁴ o

5 R⁴ y R⁵ se unen, junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo de oxazolina; R⁶ es alquilo C₁₋₆;

 R^7 y R^8 son iguales o diferentes y son independientemente alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} o PG^5 , o R^7 y R^8 se unen junto con los átomos de oxígeno a los que están unidos, para formar un cetal cíclico de 5 miembros que está sustituido en el carbono entre los átomos de oxígeno por uno o dos alquilo C_{1-6} (preferentemente dimetil o dietilcetal);

10 PG⁴ y PG⁵ son independientemente grupos protectores.

---- representa un enlace sencillo o doble, v

uno o más hidrógenos en los grupos alquilo C₁₋₆ y/o acilo C₁₋₆ está/n opcionalmente sustituidos con F;

$$R^9$$
 R^{10}
 R^{11}
 R^{13}
Fórmula B

15

en donde

R9 es COOR14

R¹⁰ es H, OH u O-acilo C₁₋₆;

R¹³ es NH-acilo C₁₋₆;

o el O en R¹⁰ y el N en R¹³ se unen por un enlace covalente;

R¹¹ y R¹² son independientemente alquilo C₁₋₆;

R¹⁴ es alquilo C₁₋₆, y

uno o más de los átomos de hidrógeno en los grupos alquilo C_{1-6} y/o acilo C_{1-6} está/n opcionalmente sustituido/s con F:

25

30

35

en donde,

 R^{15} es COOEt, COOMe, COOiPr, COORPr, COOCH $_2$ C \equiv CH, C(O)H, C(O)OH, C(O)O $^-$, CCI $_3$, CN, C \equiv CH, CH $_2$ C \equiv CH o CH $_2$ OH;

 R^{16} y R^{17} son independientemente H, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} o un grupo protector adecuado, o R^{16} y R^{17} se unen para formar un grupo protector adecuado tal como un cetal cíclico que se puede sustituir opcionalmente sobre el átomo de carbono entre los átomos de oxígeno por uno o dos grupos alquilo C_{1-6} .

R¹⁸ y R¹⁹ son independientemente H, alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆ o un grupo protector adecuado o R¹⁸ y R¹⁹ se unen para formar un grupo protector adecuado;

en donde uno o más hidrógenos en R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ R¹⁸ y/o R¹⁹ están opcionalmente sustituidos con F;

40 en donde,

 R^{15} es COOEt, COOMe, COOiPr, COORPr, COOCH2C=CH, C(O)H, C(O)OH, C(O)O-, CCI3, CN, C=CH, CH2C=CH o CH2OH;

R¹⁶ y R¹⁷ son independientemente H, alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆ o un grupo protector adecuado, o R¹⁶ y R¹⁷ se unen para

formar un grupo protector adecuado tal como un cetal cíclico que se puede sustituir opcionalmente en el átomo de carbono entre los átomos de oxígeno por uno o dos grupos alquilo C₁₋₆.

 R^{18} y R^{19} son independientemente H, alquilo C_{1-6} , acilo C_{1-6} o un grupo protector adecuado o R^{18} y R^{19} se unen para formar un grupo protector adecuado; y

R²⁰ es un grupo que se retira en condiciones de reacción de reducción o hidrogenación o R²⁰ es un grupo protector lábil ácido adecuado, por ejemplo R²⁰ es OH, R, O-R, O(C)-R, Si(R)₃, NO₂, NH₂, N(R)₂, S(O)₂R o S(O)₂OR, en donde cada R es independientemente alquilo, arilo o heteroarilo y diversos derivados sustituidos de los mismos. en donde uno o más hidrógenos en R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷ R¹⁸, R¹⁹ y/o R²⁰ está/n opcionalmente sustituidos con F;

$$R^{25}$$
 R^{25}
 R^{23}
 R^{24}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}
 R^{25}

10

en donde,

X+ es un catión;

R²¹ y R²² son independientemente H, alquilo C₁₋₆ o acilo C₁₋₆, o R²¹ y R²² se unen junto con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo de 5-10 miembros que está sin sustituir o sustituido con uno o más de halógeno o alquilo C₁₋₆;

R²³ y R²⁴ son independientemente H, alquilo C₁₋₆ y acilo C₁₋₆;

R²⁵ es OR²⁶, NR²⁷R²⁸, =O o =NR²⁹;

R²⁶ es H, alquilo C₁₋₆ o acilo C₁₋₆;

20 R²⁷ y R²⁸ son independientemente H, alquilo C₁₋₆ o acilo C₁₋₆;

R²⁹ es H, OH, alquilo C₁₋₆, O-alquilo C₁₋₆, acilo C₁₋₆, O-acilo C₁₋₆, NH₂, NH-alquilo C₁₋₆, N(alquil C₁₋₆)(acilo C₁₋₆ o NH-acilo C₁₋₆, o

R²⁹ y uno de R²³ y R²⁴ forman un grupo conector "-A-C(O)-" para proporcionar un compuesto de la fórmula:

25

en donde A es O o NH: v

uno o más hidrógenos disponibles en R²¹, R²², R²³, R²⁴, R²⁵, R²⁶, R²⁷, R²⁸ y/o R²⁹ está/n opcionalmente sustituidos con F;

30 o

en donde,

35 X+ es un catión

 R^{30} es H, alquilo C_{1-6} o acilo C_{1-6} :

R³¹ y R³² son independientemente F, alquilo C₁₋₆ o acilo C₁₋₆ o

R³¹ y R³² se unen juntos, con los átomos a los que están unidos, para formar un anillo de 5-10 miembros que está sin sustituir o sustituido con uno o más de halógeno o alguilo C₁₋₄;

40 R^{33} y R^{34} son independientemente H, alquilo C_{1-6} o acilo C_{1-6} ; y

uno o más átomos de hidrógeno disponible en R³⁰, R³¹, R³², R³³ y/o R³⁴ está/n opcionalmente sustituido/s con F o sales, solvatos, profármacos, estereoisómeros o formas marcadas son isótopos de los mismos o mezclas de los mismos.

Se desvela un compuesto de la fórmula E y R25 es =NR29.

Se desvela un análogo que es:

5

Los nombres químicos correspondientes para la estructura anterior son:

Sodio; 4-acetilamino-6-etoxi-3,5-dihidroxi-ciclohex-1-enocarboxilato (A1);

Sodio; 4-acetilamino-5-amino-3-hidroxi-ciclohex-1-enocarboxilato (A2);

Sodio: 7-acetilamino-4-hidroxi-2,2-dimetil-3a,4,7,7a-tetrahidro-benzo[1,3]dioxol- 4-carboxilato (A3);

Sodio; 7-acetilamino-6-hidroxi-2,2-dimetil-3a,4,7,7a-tetrahidro-benzo[1,3]dioxol- 4-carboxilato (A4);

Sodio; 7-acetilamino-6-hidroxiimino-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidro-benzo[1,3]dioxol-4-carboxilato (A5) y

Sodio; 7-acetilamino-6-(1-etil-propoxi)-2,2-dimetil-3a,6,7,7a-tetrahidro-benzo[1,3]dioxol-4-carboxilato (A6).

15

25

10

Mientras que los análogos descritos anteriormente se muestran en la forma de sal de sodio, se entenderá por un experto en la técnica que están disponibles otras formas de sal. Además, también se desvelan éster de carboxilato de formas de alquilo inferior (alquilo C_{1-6}).

20 "Alquilo", como se usa en el presente documento, si se usa solo o como parte de otro grupo, significa grupos alquilo saturados de cadena lineal o ramificada. "Alquilo C₁₋₆" se refiere a grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

"Acilo", como se usa en el presente documento, si se usa solo o como parte de otro grupo, significa grupos acilo saturado de cadena lineal o ramificado. "Acilo C_{1-6} " se refiere a un grupo acilo que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

"Halógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un átomo de halógeno e incluye F, Cl, Br y I.

30 Un enlace ondulado, tal como, "~~~" indica que la estereoquímica del enlace es variable. Por ejemplo, cuando se une a un doble enlace, este símbolo indica que el grupo unido al doble enlace está o en la configuración cis o trans, o el compuesto comprende una mezcla de las dos configuraciones.

"Opcionalmente sustituido", como se usa en el presente documento, significa que el grupo referenciado está sin sustituir o sustituido con uno o más grupos, por ejemplo, sustituyentes opcionales pueden incluir alcoxi C₁₋₆, nitro, ciano, hidroxilo y amino, y formas protegidas de los mismos.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de adición de ácido o sal de adición de base de un compuesto neutro, que es adecuado para, o compatible con, el tratamiento de un sujeto.

40

45

50

35

El término "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa cualquier sal orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto básico de la invención, o cualquiera de sus productos intermedios. Los ácidos inorgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos clorhídricos, bromhídricos, sulfúricos y fosfóricos, así como las sales metálicas tales como monohidrogenoortofosfato de sodio e hidrogenosulfato de potasio. Los ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos mono-, di- y tri-carboxílicos tales como ácidos glicólicos, lácticos, pirúvicos, malónicos, succínicos, glutáricos, fumáricos, málicos, tartáricos, cítricos, ascórbicos, maleicos, benzoicos, fenilacéticos, cinámicos y salicílicos, así como ácidos sulfónicos tales como ácidos p-toluenosulfónico y metanosulfónicos. Se pueden formar cualquiera de las sales de mono o di-ácido, y dichas sales pueden existir en tanto una forma hidratada, solvatada, como sustancialmente anhidra. En general, las sales de adición de ácido de los compuestos de la fórmula I son más solubles en agua y

diversos disolventes orgánicos hidrófilos, y, en general, demuestran puntos de fusión más altos en comparación con sus formas de base libre. La selección de la sal apropiada será conocida por un experto en la técnica. Se pueden usar otras sales no farmacéuticamente aceptables, por ejemplo oxalatos, por ejemplo, en el aislamiento de los compuestos de la fórmula I, para uso de laboratorio, o para conversión posterior en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. En realizaciones de la invención, la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable es la sal de clorhidrato.

5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

El término "sal de adición de base farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa cualquier sal orgánica o inorgánica no tóxica de cualquier compuesto ácido o cualquiera de sus productos intermedios. Si un compuesto comprende un grupo ácido, por ejemplo un ácido carboxílico, se forma una sal de adición de base añadiendo una base adecuada. Las bases inorgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen hidróxido de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o de bario. Las bases orgánicas ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas, tales como metilamina, trimetilamina y picolina, alquilamoniacos o amoniaco. Dichas sales pueden existir en tanto forma solvatada hidratada como sustancialmente anhidra. La selección de la sal apropiada será conocida por un experto en la técnica. En una realización de la invención, la sal de adición de base farmacéuticamente aceptable es una sal de metal alcalino tal como una sal de sodio.

La formación de una sal de compuesto deseado se logra usando técnicas convencionales. Por ejemplo, el compuesto neutro se trata con un ácido o base en un disolvente adecuado y la sal formada se aísla por filtración, extracción, o cualquier otro método adecuado.

Los inhibidores de la sialidasa Neu1 de la invención, como se definieron anteriormente, se pueden formular además como solvatos. El término "solvato" se refiere a la incorporación de moléculas de un disolvente adecuado en la red cristalina de un compuesto. Un disolvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosificación administrada. Los ejemplos de disolventes adecuados son etanol, agua y similares. Cuando el agua es el disolvente, la molécula se denomina un "hidrato". La formación de solvatos de los análogos de la invención variará dependiendo del compuesto y el solvato. En general, los solvatos se forman disolviendo el compuesto en el disolvente apropiado y aislando el solvato por enfriamiento o usando un antidisolvente. El solvato normalmente se seca o azeotropiza en condiciones ambiente.

Los análogos de oseltamivir que se han descrito anteriormente pueden incluir además formas de profármaco. En general, dichos profármacos serán derivados funcionales de un compuesto de la fórmula I que son fácilmente convertibles *in vivo* en el compuesto del que teóricamente derivan. Los profármacos de los análogos pueden ser ésteres convencionales formados con grupos hidroxi disponibles, o amino. Por ejemplo, un OH disponible o nitrógeno en un compuesto que puede ser acilado usando un ácido activado en presencia de una base, y opcionalmente, en disolvente inerte (por ejemplo, un cloruro de ácido en piridina). Algunos ésteres comunes que se han utilizado como profármacos son ésteres fenílicos, ésteres alifáticos (C₈-C₂₄), ésteres aciloximetílicos, carbamatos y ésteres de aminoácido. En ciertos casos, los profármacos de los análogos son aquellos en los que uno o más de los grupos hidroxi en los compuestos se enmascaran como grupos que se pueden convertir en grupos hidroxi *in vivo*. Se describen procedimientos convencionales para la selección y preparación de profármacos adecuados, por ejemplo, en "Design of Prodrugs" ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

El término "marca isotópica" se refiere a una forma isotópica de un átomo que es distinta de la forma más abundante de ese átomo en la naturaleza. Por ejemplo, ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C o un halógeno radiactivo tal como ¹²⁵I. Se puede preparar un compuesto marcado de la invención usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede incorporar tritio en un compuesto usando técnicas convencionales, por ejemplo por hidrogenación de un precursor adecuado en un compuesto de la invención usando gas tritio y un catalizador. Alternativamente, se puede preparar un compuesto que contiene un yodo radiactivo a partir del derivado de trialquilestaño correspondiente (adecuadamente trimetilestaño) usando condiciones estándar de yodación, tales como [¹²⁵I] yoduro de sodio en presencia de cloramina-T en un disolvente adecuado, tal como dimetilformamida. El compuesto de trialquilestaño se puede preparar a partir del compuesto de halógeno no radiactivo correspondiente, de yodo adecuado, usando condiciones convencionales de estannilación catalizadas por paladio, por ejemplo hexametildiestaño en presencia de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) en un disolvente inerte, tal como dioxano, y a temperaturas elevadas, adecuadamente 50-100 °C.

Los inhibidores de la sialidasa Neu1 pueden incluir grupos protectores sobre diversos restos químicos, la sustitución del grupo protector y/o desprotección de los restos químicos serían conocidas por un experto en la técnica.

Los términos "grupos protectores" o "PG", o similares, se refieren a un resto químico que protege o enmascara una porción reactiva de una molécula, en general, con el fin de prevenir reacciones secundarias en las porciones reactivas de la molécula mientras que se manipulan o hacen reaccionar diferentes porciones de la molécula. Después de completarse la manipulación o reacción, el grupo protector se puede retirar en condiciones que no degraden o descompongan las restantes porciones de la molécula. La selección de grupos protectores adecuados se puede hacer por un experto en la materia. Se conocen muchos grupos protectores convencionales en la técnica, por ejemplo, como se describen en "Protective Groups in Organic Chemistry" McOmie, J.F.W. Ed. Plenum Press,

1973, en Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis" John Wiley & Sons, 3ª Edición, 1999 y en Kocienski, P. "Protecting Groups", 3ª Edición, 2003, Georg Thieme Verlag (The Americas).

Los inhibidores de la sialidasa Neu1 de la invención como se definieron anteriormente pueden incluir centros asimétricos. Donde posean más de un centro asimétrico, pueden existir como diaestereómeros. Se debe entender que todos aquellos isómeros y mezclas de los mismos en cualquier proporción están englobados dentro del alcance de la presente invención. Se debe entender que mientras que la estereoquímica de los compuestos de la invención puede ser como se proporciona para cualquier compuesto dado enumerado en el presente documento, dichos compuestos de la invención también pueden contener ciertas cantidades (por ejemplo, inferiores a 20 %, preferentemente inferiores a 10 %, más preferentemente inferiores a 5 %) de los compuestos de la invención que tienen estereoquímica alterna.

Los análogos de oseltamivir se han desvelado en los documentos de patente WO 2009/137916, y WO 2011/047466.

15 Formas de administración

5

10

20

25

30

35

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden fosfato de oseltamivir, DANA o un análogo de DANA de la fórmula G como se ha definido anteriormente y que comprende además uno o más compuestos quimioterapéuticos anticancerígenos, y opcionalmente comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Después de la formulación con un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado en una dosificación deseada, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a un sujeto por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (como por polvos, pomadas, o gotas), por vía bucal, como un espray oral o nasal, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía intratumoral, o similares, dependiendo del cáncer que está tratándose. También se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden fosfato de oseltamivir en una formulación adecuada para inyección y que comprenden además un agente quimioterapéutico anticancerígeno.

El fosfato de oseltamivir o un análogo del fosfato de oseltamivir, o una sal o solvato del mismo, se puede administrar a un paciente en una variedad de formas dependiendo de la vía de administración seleccionada, como se entenderá por los expertos en la técnica. Las composiciones de la invención se pueden administrar, por ejemplo, por administración oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, rectal, parche, bomba o transdérmica (tópica) y las composiciones farmacéuticas se formularán en consecuencia. La administración parenteral incluye modos de administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, transepitelial, nasal, intrapulmonar, intratecal, rectal y tópica. La administración parenteral puede ser por infusión continua durante un periodo de tiempo seleccionado. En algunas realizaciones, el fosfato de oseltamivir, DANA o análogo de DANA de la fórmula G como se ha definido anteriormente está en una formulación adecuada para inyección y, por consiguiente, se administrará por inyección.

Se puede administrar un compuesto de la invención por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilado, o se puede encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o se puede comprimir en comprimidos, o se puede incorporar directamente con la comida de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto de la invención se puede incorporar con excipiente y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares.

- Un compuesto de la invención también se puede administrar por vía parenteral. Las disoluciones de un compuesto de la invención se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, DMSO y mezclas de los mismos, con o sin alcohol, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Un experto en la técnica conocería cómo para preparar formulaciones adecuadas. Los procedimientos convencionales y los componentes para la selección y preparación de formulaciones adecuadas se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (2000 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999.
- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Las ampollas son dosificaciones de unidad conveniente.
- Las composiciones para administración nasal se pueden formular convenientemente como aerosoles, gotas, geles y polvos. Las formulaciones en aerosol normalmente comprenden una disolución o suspensión fina de la sustancia activa en un disolvente acuoso o no acuoso fisiológicamente aceptable y normalmente se presentan en cantidades individuales o multidosis en forma estéril en un envase sellado, que puede tomar la forma de un cartucho o recarga para su uso con un dispositivo atomizador. Alternativamente, el envase sellado pueden ser un dispositivo dispensador unitario, tal como un inhalador nasal de dosis única o un dispensador de aerosol dotado de una válvula dosificadora que está prevista para ser desechada después de uso. Si la forma farmacéutica comprende un

dispensador de aerosol, contendrá un propulsor que puede ser un gas comprimido tal como aire comprimido o un propulsor orgánico tal como fluoroclorohidrocarbono. Las formas farmacéuticas en aerosol también pueden tomar la forma de un atomizador de bomba.

- Las composiciones adecuadas para administración bucal o sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar y pastillas, en donde el principio activo se formula con un vehículo tal como azúcar, goma arábiga, tragacanto, o gelatina y glicerina. Las composiciones para administración rectal están convenientemente en forma de supositorios que contienen una base de supositorio convencional, tal como manteca de cacao.
- Las composiciones para administración tópica pueden incluir, por ejemplo, propilenglicol, alcohol isopropílico, aceite mineral y glicerina. Las preparaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, solicitantes, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite tales como cremas, pomadas o pastas; o disoluciones o suspensiones tales como gotas. Además de los componentes anteriormente mencionados, las preparaciones tópicas pueden incluir uno o más componentes adicionales, tales como diluyentes, tampones, aromatizantes, aglutinantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes, por ejemplo hidroxibenzoato de metilo (incluyendo antioxidantes), agentes emulsionantes y similares.
 - Se pueden formular composiciones de liberación sostenida o directa, por ejemplo liposomas o aquellas en donde el compuesto activo se protege con recubrimientos diferencialmente degradables, tal como por microencapsulación, múltiples recubrimientos, etc. También es posible liofilizar los compuestos de la fórmula I y usar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos para inyección.

20

25

- Una variedad de sustancias adyuvantes inactivas en comprimidos o cápsulas, para ayudar en la disolución de los compuestos o modular el momento exacto de su liberación (por ejemplo, en formulaciones de liberación prolongada). Dichos componentes pueden incluir, pero no se limitan a, polietilenglicoles de alto peso molecular o polivinilpirrolidonas (por ejemplo, povidona), que se pueden formular con compuestos de la invención en dispersiones sólidas para potenciar la solubilidad gastrointestinal y/o velocidad de disolución. Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía oral en forma de disoluciones que contienen componentes de vehículo GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) para ayudar en la disolución, que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicoles de bajo peso molecular (PEGs), polivinilpirrolidonas, sorbitol, manitol y compuestos polihidroxilados similares, carboximetilcelulosa, dextranos, etc. Dichos adyuvantes de disolución también se pueden emplear en formulaciones líquidas para infusión intravenosa.
- Las formas farmacéuticas líquidas para administración por vía oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), Cremophor, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.
- 45 Las formas farmacéuticas sólidas para administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) cargas o sustancias de relleno, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes, 50 tales como glicerol, d) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción, tales como, compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita, i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de 55 sodio, y mezclas de los mismos, y (j) potenciadores de la velocidad de disolución, tales como polietilenglicoles de alto peso molecular o polivinilpirrolidona en mezclas físicas o en forma de dispersiones sólidas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica también puede comprender agentes de tamponamiento.
- Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura usando dichos excipientes como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también pueden estar en una composición que libera el (los) principio(s) activo(s) solo(s), o preferencialmente, en una cierta parte del tubo digestivo, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de incorporación de las composiciones que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura usando dichos excipientes como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes, como se observa anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación, y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte, tal como sacarosa, lactosa y almidón. Dichas formas farmacéuticas también pueden comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de formación de comprimidos y otros adyuvantes de formación de comprimidos, tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden contener opcionalmente opacificantes y también pueden ser de una composición que libere el (los) principio(s) activo(s) solo(s), o preferencialmente, en una cierta parte del tubo digestivo, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incorporación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, esprays, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y cualquier conservante o tampón necesario que se pueda requerir. También se contemplan que la formulación oftálmica, gotas óticas y colirios están dentro del alcance de la presente invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de un compuesto al cuerpo. Dichas formas farmacéuticas se preparan disolviendo o dispensando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa se puede controlar o proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz de polímero o gel.

En ciertas realizaciones, el fosfato de oseltamivir de la invención se puede administrar a niveles de dosificación de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg, o desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. También se apreciará que se pueden administrar dosificaciones más pequeñas de 0,1 mg/kg o superiores a 50 mg/kg a un sujeto.

La administración de fosfato de oseltamivir por inyección puede prevenir o reducir el fosfato activo del compuesto del que se metabolice en el hígado en la forma de carboxilato. Por consiguiente, en una realización de la invención, se administra fosfato de oseltamivir por inyección. En realizaciones adicionales, el fosfato de oseltamivir se administra por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía intratumoral.

40

45

50

55

60

65

Se pueden formular preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, disolución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. Preferentemente, se emplean polietilenglicoles o polivinilpirrolidona como agentes solubilizantes.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en aqua estéril u otro medio inyectable estéril antes de uso.

Para prolongar el efecto de un fármaco, se desea frecuentemente ralentizar la absorción del fármaco de inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo usando una suspensión líquida o cristalina o material amorfo con escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado por vía parenteral se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite. Se preparan formas de liberación prolongada inyectables formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación entre fármaco y polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen (poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos del cuerpo.

Usos médicos, terapia de combinación

5

15

20

40

45

50

En un aspecto adicional, la invención proporciona un inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se ha definido anteriormente en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes quimioterapéuticos anticancerígenos para su uso en el tratamiento del cáncer

Se entenderá que los ejemplos de cánceres descritos en relación con el uso médico anterior también se puede tratar por este uso médico de la invención.

Los ejemplos de agentes antineoplásicos (es decir, agentes quimioterapéuticos) incluyen agentes antineoplásicos seleccionados del grupo que consiste en: taxanos, compuestos coordinadores de platino, inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que son anticuerpos, inhibidores de EGF que son moléculas pequeñas, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que son anticuerpos, inhibidores de cinasas de VEGF que son moléculas pequeñas, inhibidores de MET, inhibidores de cinasas de ABL, inhibidores de ALK, inhibidores de cinasas de FLT, inhibidores de cinasas MAPK/ERK (MEK), inhibidores de cinasas RAF, inhibidores de farnesil transferasa, antagonistas de receptores de estrógeno o moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERMs), derivados de nucleósidos antitumorales, epotilonas, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca, anticuerpos que son inhibidores de integrinas, moléculas pequeñas que son inhibidores de integrinas, antagonistas de folato, inhibidores de reductasa de ribonucleótidos, antraciclinas, productos biológicos; talidomida (o imida relacionada), inhibidores de la proteína 90 de choque térmico.

En una realización, la invención proporciona un inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir,

DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente, y una cantidad eficaz de un agente
quimioterapéutico basado en cisplatino, tal como cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP), fluorouracilo,
gemcitabina, tamoxifeno, pemetrexed o una proteína unida a paclitaxel tal como Abraxane para su uso en el
tratamiento del cáncer.

30 En un aspecto adicional de la invención, se entenderá por un experto en la técnica que el inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente se puede administrar en combinación con el tratamiento estándar mejor conocido disponible para un tipo particular de cáncer para mejorar o sostener los resultados de ese tratamiento.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de un cáncer que se ha vuelto resistente al tratamiento convencional, comprendiendo dicho uso administrar dicho inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente y el tratamiento convencional para ese cáncer.

En una realización, la invención proporciona un inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente para su uso en tratar cáncer pancreático, comprendiendo dicho uso administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionados de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente, y una cantidad terapéuticamente eficaz de gemcitabina.

En otro aspecto de la invención se proporciona un inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho uso administrar simultáneamente o secuencialmente dicho inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de fosfato de oseltamivir, DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente y un agente quimioterapéutico como se describió anteriormente.

Las realizaciones de los usos médicos de la presente invención se refieren al uso de una combinación de fármacos (agentes activos) para el tratamiento del cáncer, es decir, la presente invención se refiere a una terapia de combinación para el tratamiento del cáncer. Los expertos en la técnica apreciarán que los fármacos, en general, se administran individualmente como una composición farmacéutica. El uso de una composición farmacéutica que comprende más de un fármaco está dentro del alcance de la presente invención.

Los agentes quimioterapéuticos se pueden administrar en las formas farmacéuticas que están fácilmente disponibles para el profesional clínico experto y, en general, se administran en sus cantidades normalmente prescritas (como, por ejemplo, las cantidades descritas en el Physician's Desk Reference, 57ª Edición, 2003 (publicado por Thompson PDR, Montvale, N.J. 07645-1742), o las cantidades descritas en la bibliografía de fabricación para el uso del agente).

Por ejemplo, el fosfato de oseltamivir se puede administrar por inyección, y los agentes quimioterapéuticos se

pueden administrar por vía intravenosa, normalmente como una disolución IV. El uso de una composición farmacéutica que comprende más de un fármaco también está dentro del alcance de la presente invención.

El fosfato de oseltamivir y/o el inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente y los agentes quimioterapéuticos se administran en dosificaciones terapéuticamente eficaces para obtener resultados clínicamente aceptables, por ejemplo, reducción o eliminación de síntomas o reducción o eliminación del tumor o ralentizamiento o prevención del crecimiento adicional del tumor. Así, el fosfato de oseltamivir y/o un inhibidor de la sialidasa Neu1 seleccionado de DANA y/o un análogo de DANA de la fórmula G como se definió anteriormente y agentes quimioterapéuticos se pueden administrar simultáneamente o consecutivamente en el protocolo de tratamiento. La administración de los agentes quimioterapéuticos se puede hacer según protocolos de tratamiento ya conocidos en la técnica.

Protocolo de tratamiento

5

10

30

35

40

45

50

60

El fosfato de oseltamivir y agentes quimioterapéuticos se administran en el protocolo de tratamiento que normalmente dura de uno a siete semanas, y se repite normalmente desde 6 hasta 12 veces. En general, el protocolo de tratamiento dura de una a cuatro semanas. También se pueden usar protocolos de tratamiento de una a tres semanas. También se puede usar el protocolo de tratamiento de una a dos semanas. Durante este protocolo de tratamiento o ciclo, el fosfato de oseltamivir se puede administrar en dosis diarias o en una dosis semanal. La cantidad de dosificación se pueden modificar basándose en la frecuencia de administración. La frecuencia de dosificación se puede modificar basándose en la facilidad de acceso al tratamiento. Por ejemplo, los pacientes en el hospital pueden recibir dosificación diaria, mientras que los pacientes fuera del hospital pueden recibir dosis semanales o una vez cada dos a tres semanas para coincidir con la administración de otros quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos se administran uno o más veces a la semana. En general, el agente quimioterapéutico se administra una vez a la semana o una vez cada dos o tres semanas.

Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que los protocolos de tratamiento se pueden variar según las necesidades del paciente. Así, la combinación de agentes activos (fármacos) usada en los métodos de la presente invención se puede administrar en variaciones de los protocolos descritos anteriormente. Por ejemplo, el fosfato de oseltamivir se puede administrar discontinuamente en vez de continuamente durante el ciclo de tratamiento. Así, por ejemplo, durante el ciclo de tratamiento, el fosfato de oseltamivir se puede administrar diariamente durante una semana y luego interrumpir durante una semana, repitiéndose esta administración durante el ciclo de tratamiento. O el fosfato de oseltamivir se puede administrar diariamente durante dos semanas e interrumpir durante una semana, repitiéndose esta administración durante el ciclo de tratamiento. Así, el fosfato de oseltamivir se puede administrar diariamente durante una o más semanas durante el ciclo e interrumpir durante una o más semanas durante el ciclo, repitiéndose este patrón de administración durante el ciclo de tratamiento. Este tratamiento discontinuo también se puede basar en el número de días en vez de una semana entera. Por ejemplo, dosificación diaria durante 1 a 6 días, no dosificar durante 1 a 6 días, repitiéndose este patrón durante el protocolo de tratamiento. El número de días (o semanas) en donde el fosfato de oseltamivir no se administra no tiene que ser igual al número de días (o semanas) en donde se administra el fosfato de oseltamivir. Normalmente, si se usa un protocolo de administración discontinuo, el número de días o semanas que el fosfato de oseltamivir se administra es al menos igual o superior al número de días o semanas que no se administra el fosfato de oseltamivir.

El agente quimioterapéutico se podría administrar por bolo o infusión continua. El agente quimioterapéutico se podría administrar diariamente hasta una vez cada semana, o una vez cada dos semanas, o una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas durante el ciclo de tratamiento. Si se administra diariamente durante un ciclo de tratamiento, esta dosificación diaria puede ser discontinua durante el número de semanas del ciclo de tratamiento. Por ejemplo, se administra durante una semana o varios días, repitiéndose el patrón durante el ciclo de tratamiento.

Los agentes quimioterapéuticos usados con el fosfato de oseltamivir se administran en sus dosificaciones normalmente recetas durante el ciclo de tratamiento (es decir, los agentes quimioterapéuticos se administran según la práctica estándar para la administración de estos fármacos).

Los expertos en la técnica reconocerán que las actuales dosificaciones y protocolos para administración empleados en los métodos de la presente invención se pueden variar según el criterio del profesional clínico experto. Se puede hacer una determinación para variar las dosificaciones y protocolos para la administración después de que el profesional clínico tenga en cuenta factores tales como la edad del paciente, condición y tamaño, así como la gravedad del cáncer que está tratándose y la respuesta del paciente al tratamiento.

El fosfato de oseltamivir en cualquiera de los protocolos de tratamiento anteriormente descritos se puede sustituir con uno o más análogos de fosfato de oseltamivir, o se pueden añadir uno o más análogos de fosfato de oseltamivir al protocolo de tratamiento.

Otros inhibidores de la sialidasa Neu1.

En otro aspecto de la invención se ha encontrado que el compuesto antiviral ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (DANA) es un inhibidor moderado de la sialidasa Neu1. También se ha encontrado que los análogos de DANA son inhibidores de la sialidasa Neu1. Se cree que los inhibidores de Neu1 DANA y los análogos del mismo son útiles en el tratamiento del cáncer basándose en su actividad como inhibidores de la sialidasa Neu1 y el mecanismo que se ha mostrado que conecta la inhibición de la sialidasa Neu1 con la modulación del receptor de Trk, EGFR y otros receptores mediante el paradigma de señalización de receptores descrito anteriormente.

En una realización de la invención, los análogos de DANA son de la fórmula G

en donde R^{50} es alquilo C_{1-6} en donde el alquilo puede ser alifático lineal o ramificado o el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo cíclico.

En particular, R⁵⁰ es metilo, propilo, butilo, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 2 butilo, i-butilo, t-butilo, 3-pentilo, i-propilo.

En un aspecto particular de la invención, R es metilo, propilo, butilo, 2-butilo, ciclopentilo, ciclohexilo.

20 En una realización de la invención, el análogo de DANA es: B2

Kit

30

35

5

10

25

Se desvela un kit en donde el kit comprende a) una composición farmacéutica de fosfato de oseltamivir y un vehículo farmacéuticamente aceptable y b) instrucciones que describen el método de uso de la composición farmacéutica para tratar cáncer.

También se desvela un kit en donde el kit comprende a) uno o más análogos de fosfato de oseltamivir y b) instrucciones para su uso en el tratamiento del cáncer. Opcionalmente, el kit comprende además uno o más agentes

quimioterapéuticos.

Ahora se describirán realizaciones de la invención a modo de ejemplos.

5 Materiales y métodos

Ratones

35

40

50

55

Se usó un modelo de ratón inmunodeficiente con una mutación doble en el gen 1 o 2 activante de la recombinasa de combinación (RAG1 o RAG2) y la cadena del receptor γ de citocinas común (cy) como ratones de xenoinjerto. Los ratones mutantes dobles RAG2^{-/-} x cγ^{-/-} en un acervo genético Balbc son completamente alinfoides (deficientes en linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK), no muestran formación espontánea de tumores, y presentan parámetros hematopoyéticos normales. Se generaron ratones deficientes en tanto RAG2 como cy (RAG2-/- / cy-/-) por entrecruzamiento y se mantuvieron en aisladores de SPF en la Instalación de Cuidado de Animales, Universidad de Queen, Kingston, Ontario K7L3N6, Canadá. Se estableció una colonia en el animalario. Los ratones deficientes en tanto RAG1 como cy (RAG1^{-/-}x cγ^{-/-}) en un acervo genético diabético no obeso (NOD) se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se estableció una colonia en el animalario. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones estériles en microaisladores o jaulas de aire filtrado, y se proveyeron de alimento esterilizado en autoclave y agua. Todos los ratones usados en los estudios fueron autorizados por el Comité de Cuidado Animal, Universidad de Queen. Se usaron entre 6 y 8 semanas de edad.

Líneas de células cancerosas

Las células BxPC-3 (Número ATCC®: CRL-1687™) son una línea de células de cáncer pancreático tumorigénico humano con morfología epitelial que expresa el receptor de estrógeno de unión a 17 beta-estradiol (E2) y deriva de un paciente hembra con adenocarcinoma (un cáncer de un epitelio que se origina en tejido glandular). Las células Mia-PaCa-2 (Número de ATCC®: CRL-1420™) son la línea de células de cáncer pancreático humano con células epiteliales unidas y redondeadas flotantes que expresan el receptor de estrógeno de unión a 17 beta-estradiol y derivan de un paciente masculino con carcinoma (cáncer que empieza en un tejido). Las células PANC-1 (Número ATCC®: CRL-1469™) son la línea de células de cáncer pancreático humano con morfología epitelial adherente que no expresa receptor de estrógeno y deriva de páncreas ductal con carcinoma epitelioide. Las células CAPAN-1 (Número ATCC®: HTB-79™) son la línea de células de cáncer pancreático humano con morfología epitelial que expresa el receptor de estrógeno de unión a 17 beta-estradiol (E2) y deriva de hígado metastásico con adenocarcinoma.

Las células MDA MB-231 (Número ATCC®: HTB-26™) son adenocarcinoma de mama de la glándula mamaria humana derivado de derrame pleural metastásico con morfología epitelial. MCF-7 (Número ATCC®: HTB-22™) son adenocarcinoma de mama de la glándula mamaria humana derivado de derrame pleural metastásico con morfología epitelial.

Las células A-2780 son la línea de células de cáncer de ovario humano que se establecieron a partir de tejido tumoral de un paciente sin tratar con adenocarcinoma. Las células crecen como una monocapa y en suspensión en cultivos de centrifugadora. Las células A-2780cis son el homólogo de A-2780 resistente a cisplatino.

Todas las células se cultivaron a 37 °C en 5 % de CO₂ en medios de cultivo que contenían medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Rockville, MD) complementado con 10 % de suero de ternero fetal (FCS) (HyClone, Logan, Utah, EE. UU.).

Partículas de lentivirus purificadas eGFP Lentifect

Las partículas lentivirales Lentifect™ de GeneCopoeia (Cat № LP-EGFP-LV105-0205) son partículas listas para su uso. Se producen a partir de un protocolo normalizado usando ADN de plásmido purificado y los reactivos patentados, EndoFectin™ Lenti (para transfección) y disolución TiterBoost™. El protocolo usa un sistema de encapsidación auto-inactivante de tercera generación que cumple los requisitos del Nivel 2 de Bioseguridad. Las partículas Lentifect incluyen un promotor del CMV para la eficiente expresión de eGFP no marcadas en células diana y usan un marcador de resistencia a puromicina para la selección de células establemente transducidas. Las partículas lentivirales listas para su uso se usaron para la transducción de células MiaPaCa-2 y PANC-1.

Brevemente, se cultivaron células en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos en medio DMEM que contenía 10 % de suero de ternero fetal (FCS) y 5 μg/ml de plasmocina. Después de 24 horas, se desechó el medio y se añadieron 2 ml de 5 μg/mL de medio de polibreno a las células, seguido por partículas lentivirales eGFP a MOI=6. Se mezcló la placa, se centrifugó a 2500 rpm durante 90 min y se incubó a 37 º C en estufa de incubación humidificada a 5 % de CO₂ durante 24 horas. Se lavaron las células y se volvieron a cultivar en medio durante 2 días adicionales. En el día 5, se sustituyó el medio con medio de selección que contenía de forma óptima 2 μg/ml de puromicina como se predeterminó en un ensayo de viabilidad celular. Se añadió medio de selección cada 40 horas para expandir los clones de células MiaPaCa-2 y PANC-1 transducidos con eGFP con resistencia a puromicina. Se determinó la

eficiencia de transfección de 90 % usando microscopía de fluorescencia (Zeiss Imager M2) e imágenes biofotónicas antes de la implantación en los ratones.

Implantación de células cancerosas en ratones de xenoinjerto de doble mutante RAG-1^{-/-} o RAG-2^{-/-} x cy^{-/-}

Se cultivaron en matraz de cultivo celular de 75 cm² al 80 % de confluencia clones de células MiaPaCa-2 o PANC-1 transducidas con eGFP de resistencia a puromicina. Las células se resuspendieron en disolución usando TrypLE Express (Gibco) y se lavaron con solución salina estéril. Se centrifugó la suspensión de células durante 3 min a 900 rpm, y se resuspendió el sedimento de células en solución salina estéril a una concentración de 5-10 x 10⁶ células/ml para la implantación de 1-2 x 10⁶ células en el flanco trasero derecho de ratón. Se hicieron mediciones tumorales dos veces a la semana. Se determinaron los volúmenes tumorales por (anchura al cuadrado /2) x longitud.

Ensayo de MTT

5

10

50

55

60

65

MTT es un ensayo colorimétrico para medir la actividad de enzimas que reducen MTT o colorantes estrechamente relacionados (XTT, MTS, WSTs) al colorante formazano, que da un color púrpura. Una aplicación principal permite la evaluación de la viabilidad (cifra de células) y la proliferación de células (ensayos de cultivo celular). También se puede usar para determinar la citotoxicidad de posibles agentes medicinales y materiales tóxicos, puesto que los agentes estimularían o inhibirían la viabilidad celular y el crecimiento. Se reduce MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol amarillo) a formazano púrpura en células vivas. Se añade una disolución de solubilización (normalmente o sulfóxido de dimetilo, una disolución acidificada de etanol, o una disolución del detergente dodecilsulfato sódico en ácido clorhídrico diluido) para disolver el producto de formazano púrpura insoluble en una disolución coloreada. La absorbancia de esta disolución coloreada se puede cuantificar midiendo a una cierta longitud de onda (normalmente entre 500 y 600 nm) por un espectrofotómetro. El máximo de absorción depende del disolvente empleado.

Reactivo WST-1 de proliferación celular

WST-1 (Roche Applied Sciences, Montreal) es un sustrato listo para uso que mide la actividad metabólica de células viables. El ensayo de WST-1 es no radiactivo y se puede realizar completamente en una microplaca. Es adecuado para medir la proliferación celular, viabilidad celular o citotoxicidad. El ensayo se basa en la reducción de WST-1 por células viables. La reacción produce una sal soluble de formazano. El procedimiento implica: Cultivar las células en una microplaca de 96 pocillos, luego incubarlas con WST-1 durante aprox. 0,5-4 h. Durante este periodo de incubación, las células viables convierten WST-1 en un colorante de formazano soluble en agua. La cuantificación del colorante de formazano en la microplaca se hace con un lector de placas de ELISA. La absorbancia se correlaciona directamente con el número de células.

Quimioterapéuticos

El cisplatino, o *cis*-diaminodicloroplatino(II) (CDDP), es un fármaco quimioterapéutico basado en platino usado para tratar diversos tipos de cánceres, que incluyen sarcomas, algunos carcinomas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de ovario), linfomas y tumores de células germinativas. Fue el primer miembro de una clase de fármacos anticancerígenos que ahora también incluyen carboplatino y oxaliplatino. Estos complejos de platino reaccionan *in vivo*, uniéndose a y causando la reticulación de ADN que por último lugar desencadena la apoptosis (muerte celular programada).

El fluorouracilo (5-FU o f5U) (comercializado con los nombres de marca Adrucil, Carac, Efudex y Fluoroplex) es un fármaco que es un análogo de pirimidina que se usa en el tratamiento del cáncer. Funciona mediante la inhibición no competitiva de la timidilato sintasa. Debido a su naturaleza no competitiva y efectos sobre la síntesis de timidina, 5-FU se denomina frecuentemente el "inactivador suicida". Pertenece a la familia de los fármacos denominados antimetabolitos. Normalmente se administra con leucovorina.

La gemcitabina se usa en diversos carcinomas: cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer de vejiga y cáncer de mama. Está siendo investigado para su uso en cáncer de esófago, y se usa experimentalmente en linfomas y diversos otros tipos de tumor. La gemcitabina representa un avance en el cuidado del cáncer pancreático. También no es tan debilitante como algunas otras formas de quimioterapia. Como con el fluorouracilo y otros análogos de pirimidinas, el análogo de trifosfato de gemcitabina sustituye uno de los elementos estructurales de ácidos nucleicos, en este caso citidina, durante la replicación del ADN. El proceso detiene el crecimiento tumoral, ya que los nuevos nucleósidos no se pueden unir al nucleósido "defectuoso", dando como resultado la apoptosis.

El tamoxifeno se une competitivamente a receptores de estrógeno sobre tumores y otras dianas de tejido, produciendo un complejo nuclear que disminuye la síntesis de ADN e inhibe los efectos de estrógeno. Es un agente no esteroideo con potentes propiedades antiestrogénicas que compite con el estrógeno por los sitios de unión en mama y otros tejidos. El tamoxifeno provoca que las células permanezcan en las fases G0 y G1 del ciclo celular. Debido a que previene que células (pre)cancerosas se dividan, pero no provoca la muerte celular, el tamoxifeno es

citostático en vez de citocida. El tamoxifeno es un profármaco, que tiene relativamente poca afinidad por su proteína diana, el receptor de estrógeno. Es metabolizado en el hígado por la isoforma de citocromo P450 CYP2D6 y CYP3A4 en metabolitos activos tales como 4-hidroxitamoxifeno y N-desmetil-4-hidroxitamoxifeno (endoxifeno), que tienen 30-100 veces más afinidad con el receptor de estrógeno que el propio tamoxifeno. GPR30 es un GPCR sensible a estrógeno (receptor acoplado a la proteína G de 7 transmembrana). GPR30 es un receptor acoplado a la proteína G de 7 transmembrana (GPCR) que se ha mostrado que es un receptor sensible a estrógenos, expresado predominantemente en el retículo endoplásmico. La señalización ocurre mediante la activación de la proteína G heterotrimérica, dando como resultado la activación de la metaloproteinasa de matriz, liberación de EGF de unión a heparina y transactivación de EGFR con posterior activación de MAPK y Akt. El tamoxifeno actúa diferencialmente sobre la transducción de señales nucleares mediadas por GPR30 y ER y que el tamoxifeno activa GPR30 en un modo espacialmente diferente del estrógeno.

Pemetrexed (nombre de marca Alimta) es un fármaco quimioterapéutico fabricado y comercializado por Eli Lilly and Company. Sus indicaciones son el tratamiento de mesotelioma pleural, así como cáncer de pulmón de células no pequeñas. Pemetrexed es químicamente similar al ácido fólico y está en la clase de los fármacos quimioterapéuticos denominados los antimetabolitos de folato. Funciona inhibiendo las tres enzimas usadas en la síntesis de purina y pirimidina: timidilato sintasa (TS), dihidrofolato reductasa (DHFR) y formiltransferasa de ribonucleótido de glicinamida (GARFT). Inhibiendo la formación de purina precursora y nucleótidos de pirimidina, pemetrexed previene la formación de ADN y ARN, que se requieren para el crecimiento y la supervivencia de tanto células normales como células cancerosas.

ABRAXANE para suspensión inyectable (partículas unidas a proteínas de paclitaxel para suspensión inyectable) (unida a albúmina) se indica para el tratamiento del cáncer de mama después del fracaso de la quimioterapia de combinación para enfermedad metastásica o recaída en el plazo de 6 meses desde la quimioterapia adyuvante.

El fosfato de oseltamivir se preparó a partir de comprimidos comercialmente disponibles de fosfato de oseltamivir comercializado como Tamiflu. Las cápsulas de 75 mg de Tamiflu se solubilizaron en solución salina estéril y se desechó la carga no disuelta.

30 Estadística

5

10

15

20

25

35

40

45

50

55

Se hicieron comparaciones entre dos grupos por ANOVA unilateral al 95 % de confianza usando la prueba de la t para datos independientes y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni o la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett para comparaciones entre más de dos grupos.

Ejemplo 1

Valores de DL_{50} para los efectos del fosfato de oseltamivir sobre la viabilidad celular de células de cáncer pancreático, de mama y ovario en cultivo

Los datos en la Tabla 1 indican la dosis individual de tratamiento de fosfato de oseltamivir de líneas de células de cáncer pancreático, de mama y ovario en cultivo que se requiere para destruir el 50 por ciento de las células viables (DL $_{50}$). Los valores de DL $_{50}$ se dan como μ M de concentración de fármaco determinada por ensayo de MTT o WST-1 después de 72 horas de incubación. Los resultados indican que las tres células de cáncer pancreático (MiaPaCa-2, PANC-1 y BxPC-3) que son resistentes a quimioterapéuticos tienen altos valores de DL $_{50}$ en el intervalo de 850-1462 μ M de tratamiento de fosfato de oseltamivir en comparación con el bajo valor de 2 μ M de tratamiento de fosfato de oseltamivir de la línea de células de cáncer pancreático metastásico Capan-1 sensibles a la quimioterapia. Además, dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA MB-231 resistente a la quimioterapia y MCF-7 sensible a la quimioterapia) y dos líneas de células de cáncer de ovario (A 2780cis resistente a la quimioterapia y A 2780 sensible a la quimioterapia) tras el tratamiento de fosfato de oseltamivir mostraron bajos valores de DL $_{50}$ en el intervalo de 0,6-3 μ M. Estos datos *in vitro* indican que el fosfato de oseltamivir puede invertir la resistencia a quimioterapia en líneas celulares de cáncer pancreático, de mama y ovario.

Tabla 1. Valores de DL₅₀ para los efectos de fosfato de oseltamivir sobre la viabilidad celular de células cancerosas en cultivo

		en cultivo	
Cáncer	Línea celular	Sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos	DL ₅₀ (μM)
Pancreático	MiaPaCa	resistente	850
	PANC-1	resistente	1462
	BxPC-3	resistente	975
	Capan-1	sensible	2
Mama	MDA MB-231	resistente	0,6
	MCF-7	sensible	>3

(continuación)

Cáncer	Línea celular	Sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos	DL ₅₀ (μM)
Ovario	A 2780	sensible	1,5
	A 2780cis	resistente	1,0

El valor DL_{50} se da como μM de concentración de fármaco determinada por el ensayo de MTT o WST-1 después de 72 horas de incubación. DL_{50} representa la dosis individual requerida para destruir el 50 por ciento de las células viables.

Se mostró que el fosfato de oseltamivir usado en combinación con gemcitabina, cisplatino, 5-fluorouracilo y tamoxifeno era particularmente eficaz en casos en los que las células cancerosas se habían vuelto resistentes a la quimioterapia convencional (Tablas 2-4). Es de notar que el fosfato de oseltamivir a 730 μ M de tratamiento de células BxPC-3 usadas en combinación con los fármacos quimioterapéuticos estándar indicados aumentó la sensibilidad (DL50) de cisplatino en un aumento de 5 veces, 5-fluoruracilo en 16, tamoxifeno en 3 y gemcitabina en 1 (Tabla 2). El fosfato de oseltamivir a 1460 μ M de tratamiento de células BxCP-3 usado en combinación con los fármacos quimioterapéuticos estándar indicados adicionales aumentó la sensibilidad de 5-fluoruracilo en un incremento de 160 veces, tamoxifeno en 115 y gemcitabina en 0,78. Tendencias similares de sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos con tratamiento de fosfato de oseltamivir se muestran para células PANC-1 (Tabla 3) y MiaPaCa-2 (Tabla 4).

10

15

Tabla 2. Valores de DL₅₀ para los efectos del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) con fármacos quimioterapéuticos estándar sobre la viabilidad celular de las células cancerosas en cultivo

Cáncer	Líneas celulares	Fármaco quimioterapéutico	Dosificación de fosfato de oseltamivir (µM)	DL ₅₀ de fármaco quimioterapéutico (μM)	Sensibilidad al fármaco quimioterapéutico con fosfato de oseltamivir (incremento en veces)
Pancreático	BxPC-3	cisplatino	0	4,2	
		cisplatino	730	0,78	5
		5-fluoruracilo	0	12,5	
		5-fluoruracilo	730	0,78	16
		5-fluoruracilo	1460	0,078	160
		tamoxifeno	0	9	
		tamoxifeno	730	3	3
		tamoxifeno	1460	0,078	115
		gemcitabina	0	0,78	
		gemcitabina	730	0,78	1
		gemcitabina	1460	1	0,78

El valor DL_{50} se da como μM de concentración de fármaco quimioterapéutico con o sin fosfato de oseltamivir como se ha determinado por el ensayo de MTT después de 72 horas de incubación. DL_{50} representa la dosis individual requerida para destruir el 50 por ciento de las células viables.

Tabla 3. Valores de DL₅₀ para los efectos del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) con fármacos

qu	ımıoterapeuti	cos estandar sobre la	viabilidad celular	de celulas cancerosa	s en cultivo	
Cáncer	Líneas celulares	Fármaco quimioterapéutico	Dosificación de fosfato de oseltamivir	DL ₅₀ de fármaco quimioterapéutico (μΜ)	Sensibilidad fármaco quimioterapéut	al ico
			(μΜ)	(1-1-7)	con fosfato oseltamivir	de
					(incremento veces)	en
Pancreático	PANC-1	cisplatino	0	>12		
		cisplatino	730	6,25	2	
		5-fluoruracilo	0	3,1		

(continuación) Cáncer Líneas Fármaco Dosificación DL₅₀ de fármaco Sensibilidad al celulares quimioterapéutico de fosfato de quimioterapéutico fármaco oseltamivir quimioterapéutico (μM) (μM) con fosfato de oseltamivir (incremento en veces) 5-fluoruracilo 730 8,0 0,078 40 5-fluoruracilo 1460 tamoxifeno 12,5 tamoxifeno 730 0,8 16 tamoxifeno 160 1460 0,078 gemcitabina >26 730 gemcitabina 1,6 16 gemcitabina 1460 1,5 17

El valor DL₅₀ se da como μM de concentración de fármaco quimioterapéutico con o sin fosfato de oseltamivir como se ha determinado por el ensayo de MTT después de 72 horas de incubación. DL₅₀ representa la dosis individual requerida para destruir el 50 por ciento de las células viables.

Tabla 4. Valores de DL₅₀ para los efectos del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) con fármacos quimioterapéuticos estándar sobre la viabilidad celular de células cancerosas humanas en cultivo

Cáncer	Líneas celulares	Fármaco quimioterapéutico	Dosificación de fosfato de oseltamivir (µM)	DL ₅₀ de fármaco quimioterapéutico (μM)	Sensibilidad al fármaco quimioterapéutico con fosfato de oseltamivir (incremento en
Pancreático	MiaPaCa-2	cisplatino	0	6,25	veces)
1 ancreatico	IVIIAI AOA-2	cisplatino	730	0,8	8
		5-fluoruracilo	0	2,20	
		5-fluoruracilo	730	0,6	4
		5-fluoruracilo	1460	0,078	28
		tamoxifeno	0	7,0	
		tamoxifeno	730	0,8	9
		tamoxifeno	1460	0,078	90
		gemcitabina	0	0,78	
		gemcitabina	730	0,78	1
		gemcitabina	1460	0,078	10

El valor DL_{50} se da como μM de concentración de fármaco quimioterapéutico con o sin fosfato de oseltamivir como se ha determinado por el ensayo de MTT después de 72 horas de incubación. DL_{50} representa la dosis individual requerida para destruir el 50 por ciento de las células viables.

Los datos mostrados en la Tabla 5 indican un incremento de 2 veces en la sensibilidad de DL₅₀ (μM) de los fármacos quimioterapéuticos gemcitabina y Abraxane usados en combinación con fosfato de oseltamivir 730 μM para células Capan-1 metastásicas pancreáticas, dos líneas de células de cáncer de mama (MDA MB-231 resistentes a fármacos quimioterapéuticos y MCF-7 sensible a fármacos quimioterapéuticos) y dos líneas de células de cáncer de ovario (A 2780cis resistente a fármacos quimioterapéuticos).

5

Tabla 5. Valores de DL₅₀ para los efectos del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) con fármacos quimioterapéuticos estándar sobre la viabilidad celular de células cancerosas humanas en cultivo

Cáncer	Líneas celulares	Fármaco quimioterapéutico	Dosificación de fosfato de	DL ₅₀ de fármaco quimioterapéutico	Sensibilidad fármaco	al
			oseltamivir (μΜ)	(μΜ)	quimioterapéutico con fosfato	de
			· ,		oseltamivir	
					(incremento veces)	en
Pancreático	Capan-1	gemcitabina	0	60		
		gemcitabina	730	30	2	
		Abraxane	0	40		
		Abraxane	730	40	1	
Mama	MDA MB- 231	gemcitabina	0	70		
		gemcitabina	730	40	2	
		Abraxane	0	40		
		Abraxane	730	29	1,4	
	MCF-7	gemcitabina	0	40		
		gemcitabina	730	40	1	
		Abraxane	0	40		
		Abraxane	730	18	2,2	
Ovario	A 2780	gemcitabina	0	60		
		gemcitabina	730	40	1,5	
	A 2780cis	gemcitabina	0	60		
		gemcitabina	730	40	1,5	

El valor DL₅₀ se da como μM de concentración de fármaco determinada por el ensayo de WST-1 después de 72 horas de incubación. DL₅₀ representa la dosis individual requerida para destruir el 50 por ciento de las células viables.

Ejemplo 2

5

10

15

20

Los valores de DL50 para los efectos de los análogos de oseltamivir sobre la viabilidad celular de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2 y PANC-1 en cultivo

Se desvelan análogos de oseltamivir y métodos de preparación de los mismos en los documentos de patente WO 2009/137916 y WO 2011/047466. Los valores de DL₅₀ en μM para los efectos de análogos sobre la viabilidad celular de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2 y Panc-1 en cultivo se muestran en la Tabla 6. El análogo de oseltamivir A2 mostró la potencia más alta con una DL₅₀ de 1,97 μM para células MiaPaCa-2 y 0,01 μM para células PANC-1 en comparación con fosfato de oseltamivir de 850 μM para células MiaPaCa-2 y 1462 μM para células PANC-1. El análogo de oseltamivir con la siguiente potencia más alta fue A5 (24 μM para células MiaPaCa-2 y 3 μM para células PANC-1), seguido por A3, A1, A3 y A6 con potencia decreciente en DL₅₀. Estos datos *in vitro* establecen la prueba de concepto de que los análogos de fosfato de oseltamivir también pueden invertir la resistencia a quimioterapia en líneas celulares de tumores pancreáticos (por ejemplo, MiaPaCa y PANC-1).

Tabla 6. Valores de DL50 para los efectos de fosfato de análogos de oseltamivir (TD) sobre la viabilidad celular de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2 y Panc-1 en cultivo

TD	DL ₅₀ (μM)		TD	DL ₅₀ (_I	μM)
Estructura	MiaPaCa-2	PANC-1	Estructura	MiaPaCa-2	PANC-1
fosfato de oseltamivir	850	1462	н _н ы он мнас	1,97	0,01
но мнае	132	848	cobus Horman	2,8	349

(continuación)

TD	DL ₅₀ (μΜ)	TD	DL ₅₀ (μM)
Estructura	MiaPaCa-2	PANC-1	Estructura	MiaPaCa-2	PANC-1
Na OÔC OH ON OH ON OH	2,1	>1000	HO NHAC	24	3
А3			A 5		
COO NR	>2000	>2000			
A6					

El valor DL_{50} se da como μM de concentración de fármaco determinada por el ensayo de WST-1 después de 72 horas de incubación. La DL_{50} representa la dosis individual requerida para destruir el 50 por ciento de las células viables.

Ejemplo 3

10

15

20

25

30

35

5 El efecto de fosfato de oseltamivir a diferente dosificación sobre el volumen tumoral (mm³) sobre células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy

También se investigó la actividad antitumoral *in vivo* de fosfato de oseltamivir en un modelo de ratón macho de xenoinjerto de doble mutante RAG2/Cy de cáncer pancreático humano. Se implantaron las células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP a 1,5 x 10⁶ en 0,2 ml por vía subcutánea en el flanco trasero derecho de estos ratones. Cada ratón en el estudio se identificó por un número de punción en la oreja. Dos veces a la semana, cada ratón tras la implantación de las células cancerosas se monitorizó para el crecimiento de volumen tumoral (longitud y anchura) en el sitio de implantación, pesos corporales y puntuación de la condición corporal. La puntuación de la condición corporal de roedores es un método no invasivo para evaluar la salud y establecer criterios de valoración para adultos donde el peso corporal no es una herramienta de monitorización viable, tal como con modelos tumorales. Las puntuaciones de la condición corporal (BC) varían desde 1 (emaciación) hasta 5 (obesidad). Un BCS anticipado de 2 - por debajo de la condición - o inferior, requiere la justificación en el protocolo. Las puntuaciones se determinan por examen visual frecuente y práctico de cada animal. La evaluación práctica se hace sujetando suavemente el ratón por la base de la cola y pasando un dedo sobre los huesos sacroilíacos. Los hallazgos se corresponden con las descripciones y los diagramas de los intervalos de BC para determinar una puntuación. Las puntuaciones se documentan para cada animal.

Los datos en la Tabla 7 muestran que el tratamiento de monoterapia de fosfato de oseltamivir de 2, 10, 50 y 100 mg/kg por vía intraperitoneal en el día 40 después de la implantación cuando el volumen tumoral era 50-100 mm³ redujo eficiente y significativamente el crecimiento tumoral en un tiempo hasta la progresión en más de 50 % y prolongó significativamente las tasas de supervivencia (Figura 1) en comparación con los grupos de control no tratados. Además, hubo una reducción marcada, pero no significativa, en el peso tumoral en comparación con la cohorte de control no tratado (Figura 1). El tratamiento de monoterapia de fosfato de oseltamivir de los ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy implantados con células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP son reproducibles usando dosificaciones de 50, 100 y 200 mg/kg (Tabla 8 y Figura 2). Estos hallazgos soportan la hipótesis de que la monoterapia de fosfato de oseltamivir tiene posibles propiedades proliferativas antitumorales *in vivo* y sostiene la evidencia de apoyo encontrada en los resultados *in vitro*.

Tabla 7. El efecto de la dosificación de fosfato de oseltamivir sobre el volumen tumoral (mm³) sobre células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy

		Volumen	tumoral				
Días después de	Dosificación	no tratados (n)	fosfato	de	% de	valor p	(n)
la implantación			oseltamivir (n)		inhibición		
48	2 mg/kg	965 ± 107 (10)	370 ± 88 (5)		61,7%	0,0013	(15)
48	10 mg/kg	965 ± 107 (10)	275 ± 71 (6)		71,5%	0.0005	(16)
48	50 mg/kg	965 ± 107 (10)	383 ± 71 (4)		60,3%	0,0040	(14)
48	100 mg/kg	965 ± 107 (10)	397 ± 57 (5)		58,9%	0,0013	(15)

(continuación)

Volumen tumoral								
Días después de	Dosificación	no tratados (n)	fosfato	de	%	de	valor p	(n)
la implantación			oseltamivir (n)		inhibició	'n		
61	2 mg/kg		636 ± 35 (2)		34,1%		0,049	(12)
61	10 mg/kg		711 ± 159 (5)		26,3%		ns	(15)
61	50 mg/kg		652 ± 173 (3)		32,4%		ns	(13)
61	100 mg/kg		701 ± 201 (3)		27,4%		ns	(13)

Tabla 8. El efecto de la dosificación de fosfato de oseltamivir sobre el volumen tumoral (mm³) sobre células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy

		Volumen tu	moral			
Días después de la	Dosificación	no tratados (n)	fosfato de	% de	valor p	(n)
implantación			oseltamivir (n)	inhibición	•	
46	50 mg/kg	930 ± 129 (8)	368 ± 38 (4)	60,4%	0,0040	(12)
46	100 mg/kg	930 ± 129 (8)	362 ± 62 (4)	61,0%	0.0006	(16)
46	200 mg/kg	930 ± 129 (8)	386 ± 88 (4)	58,5%	0,0081	(12)

Se investigó el efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (10 mg/kg al día) con Alimta (100 mg/kg 18 inyecciones) o Abraxane (200 mg/kg inyección única) sobre el volumen tumoral (mm³) de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy

5

10

15

20

25

30

Para evaluar la amplia eficacia in vivo de 10 mg/kg de dosificación de fosfato de oseltamivir en combinación con los fármacos quimioterapéuticos estándar Alimta y Abraxane contra el crecimiento y la extensión de los tumores pancreáticos. Se implantó el modelo de ratón de xenoinjerto de doble mutante RAG2/Cy con 1,5 x 106 células MiaPaCa-2-eGFP en 0,2 ml en el flanco trasero derecho. Cuando el volumen tumoral en el sitio de implantación alcanzó 50-100 mm³, los ratones se trataron con Alimta a 100 mg/kg por vía intraperitoneal (I.P.) durante un total de 18 inyecciones, 200 mg/kg de Abraxane como una inyección I.P. única, o en combinación con fosfato de oseltamivir a 10 mg/kg I.P. al día. Los datos en la Tabla 9 muestran que 10 mg/kg de fosfato de oseltamivir en combinación con Alimta o Abraxane redujeron eficientemente el crecimiento tumoral en un tiempo hasta la progresión en el día 48 después de la implantación en el 77 % en combinación con Almita y 94 % con Abraxane en comparación con la cohorte de control. En el día 63 después de la implantación, hubo 40-75 % de reducción en el volumen tumoral con el tratamiento de combinación. En el día 84 y 101 después de la implantación, la combinación de Abraxane y fosfato de oseltamivir mantuvo un 70 % y 40 % de reducción, respectivamente, en el crecimiento tumoral en comparación con la cohorte de control. Además, la combinación de Abraxane y fosfato de oseltamivir prolongó significativamente las tasas de supervivencia de los ratones portadores de tumor en 101 días, seguido por la monoterapia de Abraxane en el día 87, monoterapia de Alimta y la combinación de Alimta y fosfato de oseltamivir en el día 70 en comparación con los grupos de control no tratados en el día 51 (Figura 3). Además, hubo una reducción notable, pero no significativa, en el peso tumoral, excepto por la monoterapia de Abraxane en comparación con la cohorte de control no tratado (Figura 3).

Tabla 9. El efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (10 mg/kg al día) y Alimta (100 mg/kg) o Abraxane (200 mg/kg) sobre el volumen tumoral (mm³) sobre células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinierto Balbc de doble mutante RAG2/Cv

-l · · · · · · -	Γ4	D 'f' ' f -	T	1/-1	0/ -1- !
•					% de inhibición a
	quimioterapéutico	(mg/kg)	oseltamivir		no tratado
ntación			(mg/kg)	(mm³)	
	no tratado	0	0	809	
	Alimta	100	0	225	72 %
	Alimta	100	10	189	77 %
	Abraxane	200	0	201	75 %
	Abraxane	200	10	50	94 %
	Alimta	100	0	482	40 %
	Alimta	100	10	787	3 %
	Abraxane	200	0	358	56 %
	Abraxane	200	10	199	75 %
	Abraxane	200	0	864	0,06 %
	Abraxane	200	10	245	70 %
	Abraxane	200	10	487	40 %
	después la itación	no tratado Alimta Abraxane Alimta Alimta Abraxane Abraxane Abraxane Abraxane Abraxane Abraxane Abraxane Abraxane Abraxane	la quimioterapéutico (mg/kg)	la quimioterapéutico (mg/kg) oseltamivir (mg/kg) no tratado 0 0 Alimta 100 0 Abraxane 200 0 Abraxane 200 10 Alimta 100 0 Abraxane 200 10 Alimta 100 0 Alimta 100 10 Abraxane 200 0 Abraxane 200 0 Abraxane 200 10 Abraxane 200 0 Abraxane 200 0 Abraxane 200 10	la quimioterapéutico

Los datos en la Tabla 10 indican las metástasis hepáticas como una medida del número promedio de nódulos y el tamaño nodular en mm en cada una de las cohortes de tratamiento anteriores. Hubo una reducción significativa en

las metástasis hepáticas en más de 80 % en las cohortes tratadas cuando se compara con el control no tratado. Además, la combinación de Almita o Abraxane con fosfato de oseltamivir redujo además las metástasis hepáticas en 6 % con respecto a la monoterapia de los fármacos quimioterapéuticos. Los resultados en la Figura 4 muestran las imágenes biofotónicas de los diferentes tejidos obtenidos de la autopsia. El color negro en los tejidos es indicativo de la presencia de células MiaPaCa-2-eGFP fluorescentes.

Tabla 10. El efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (10 mg/kg al día) y Alimta (100 mg/kg) o Abraxane (200 mg/kg) sobre las metástasis hepáticas con las células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en

ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy

	14101100	do kononijono E	dibo de dobie il	ratarito i il tazi og		
Días después de la implantación	Fármaco quimioterapéutico	Dosificación (mg/kg)	Fosfato de oseltamivir (mg/kg)	Metástasis hepáticas (nº promedio de nódulos)	porcentaje de inhibición	Metástasis (tamaño, mm)
51	no tratado	0	0	33		0,3-1,5
70	Altima	100	0	5	85 %	0,2-1,0
70	Altima	100	10	3	91 %	0,2-0,5
87	Abraxane	200	0	7	79 %	020,7
101	Abraxane	200	10	5	85 %	0.3-1.0

10

25

5

Se investigó el efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (100 mg/kg al día) con tamoxifeno (0,1 mg/kg) sobre el volumen tumoral (mm³) de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de xenoinjerto Balbc de doble mutante RAG2/Cy

Para evaluar más la amplia eficacia *in vivo* de 100 mg/kg de dosificación de fosfato de oseltamivir en combinación con el quimioterapéutico estándar tamoxifeno contra el crecimiento y la extensión de tumores pancreáticos. Se implantó el modelo de ratón de xenoinjerto de doble mutante RAG2/Cy con 1,5 x 10⁶ células MiaPaCa-2-eGFP en 0,2 ml en el flanco trasero derecho. Cuando el volumen tumoral en el sitio de implantación alcanzó 50-100 mm³, los ratones se trataron con tamoxifeno a 0,1 mg/kg por vía intraperitoneal (I.P.) durante un total de 15 inyecciones o en combinación con fosfato de oseltamivir a 100 mg/kg I.P., al día. Los datos en la Tabla 11 muestran que 100 mg/kg de fosfato de oseltamivir en combinación con tamoxifeno redujeron eficientemente el crecimiento tumoral en un tiempo hasta la progresión en el día 59 después de la implantación en 43 %, en el día 62 en 56 %, en el día 66 en 47 % y en el día 73 en 17 %.

Tabla 11. El efecto del co-tratamiento de 100 mg/kg de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) y 0,1 mg/kg de Tamoxifeno sobre el volumen tumoral (mm³) de células de cáncer pancreático MiaPaCa-2-eGFP implantadas en ratones de

- D' '	xenoinjerto Balbc de doble mutante	•	0/ 1 1 1 1 1 1 /
Días después de la	Tratamiento	Volumen	% de inhibición
implantación		tumoral (mm³)	a no tratado
59	no tratado	2214 ± 1288 (2)	
59	tamoxifeno	960 ± 208 (4)	57 %
59	tamoxifeno + fosfato de oseltamivir	1266 ± 377 (4)	43 %
62	no tratado		
62	tamoxifeno	1738 ± 328 (4)	21 %
62	tamoxifeno + fosfato de oseltamivir	984 ± 283 (3)	56 %
66	no tratado		
66	tamoxifeno	2650 ± 360 (3)	0 %
66	tamoxifeno + fosfato de oseltamivir	1181 ± 180 (3)	47 %
73	no tratado		
73	tamoxifeno		
73	tamoxifeno + fosfato de oseltamivir	1845 ± 5 (3)	17 %

30

Además, la combinación de fosfato de oseltamivir y tamoxifeno prolongó significativamente las tasas de supervivencia de los ratones portadores de tumor en 76 días, seguido por monoterapia de tamoxifeno en el día 66 en comparación con los grupos de control no tratados en el día 60 (Figura 5).

35

El efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir con los quimioterapéuticos Abraxane y gemcitabina sobre el volumen tumoral (mm³) de células de cáncer pancreático humanas PANC-1 implantadas en ratones de xenoinjerto NOD de doble mutante RAG1/Cy

Se investigó la eficacia *in vivo* de 2 o 5 mg/kg de dosificación de fosfato de oseltamivir en combinación con los quimioterapéuticos estándar Abraxane y gemcitabina contra el crecimiento y la extensión de otro tumor pancreático usando células de cáncer pancreático PANC-1. Se implantó el modelo de ratón de xenoinjerto de doble mutante

RAG1/Cy con 2 x 10⁶ células PANC-1 en 0,2 ml en el flanco trasero derecho. Cuando el volumen tumoral en el sitio de implantación alcanzó 50-100 mm³, los ratones se trataron con monoterapia de fosfato de oseltamivir a 2 y 5 mg/kg por vía intraperitoneal (I.P.), inyecciones diarias, 0,5 mg/kg de Abraxane I.P. una vez a la semana, 30 mg/kg de gemcitabina i.p. una vez a la semana o en combinación con fosfato de oseltamivir en ambas dosificaciones con Abraxane o gemcitabina. Los datos en la Tabla 12 muestran que 2 o 5 mg/kg de monoterapia de fosfato de oseltamivir redujeron eficientemente el crecimiento tumoral en un tiempo hasta la progresión en el día 79 después de la implantación en 31-35 %, pero perdió su efecto en el día 93. Es de notar que la baja dosificación de 0,5 mg/kg para Abraxane tuvo poco efecto sobre el volumen tumoral, pero en combinación con 2 o 5 mg/kg de fosfato de oseltamivir redujo eficientemente el crecimiento tumoral en 19-25 % en el día 79 y en 17 % en el día 84 después de la implantación cuando se comparó con la cohorte no tratada.

Tabla 12. El efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) y quimioterapéuticos sobre el volumen tumoral (mm³) sobre células de cáncer pancreático humano PANC-1 implantadas en ratones de xenoinjerto NOD de doble mutante BAG1/Cv

10

15

20

25

30

35

Días después de	doble mutante HAG Días después de Tratamiento (mg/kg)		% Inhibición a no	
la implantación	(°C)	(mm ³) (n ratones)	tratado)
79	No tratado	1388 ± 114 (6)		
79	fosfato de oseltamivir (2)	901 ± 104 (5)	35 %	(n.s.)
79	fosfato de oseltamivir (5)	956 ± 345 (4)	31 %	(n.s.)
79	Abraxane (0,5)	1655 ± 190 (3)	0 %	(n.s.)
79	Abraxane (0,5) + fosfato de oseltamivir (2)	1130 ± 35 (3)	19 %	(n.s.)
79	Abraxane (0,5) + fosfato de oseltamivir (5)	1041 ± 185 (5)	25 %	(n.s.)
79	Gemcitabina (30)	200 ± 47 (5)	86 %	(p < 0.0001)
79	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (2)	118 ± 38 (6)	91 %	(p < 0.0001)
79	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (5)	101 ± 15 (6)	93 %	(p < 0.0001)
84	fosfato de oseltamivir (2)	1079 ± 91 (5)	22 %	(n.s.)
84	fosfato de oseltamivir (5)	1321 ± 503 (4)	5 %	(n.s.)
84	Abraxane (0,5) + fosfato de oseltamivir (2)	1825 ± 615 (2)	0 %	(n.s.)
84	Abraxane (0,5) + fosfato de oseltamivir (5)	1150 ± 167 (5)	17 %	(n.s.)
84	Gemcitabina (30)	159 ± 52 (5)	89 %	(p < 0.0001)
84	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (2)	96 ± 37 (6)	93 %	(p < 0.0001)
84	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (5)	118 ± 38 (5)	91 %	(p < 0.0001)
93	fosfato de oseltamivir (2)	1554 ± 469 (2)	0 %	(n.s.)
93	fosfato de oseltamivir (5	1406 ± 471 (2)	0 %	(n.s.)
93	Gemcitabina (30)	437 ± 140 (3)	69 %	(p < 0.0001)
93	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (2)	167 ± 44 (6)	89 %	(p < 0.0001)
93	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (5)	149 ± 29 (5)	89 %	(p < 0.0001)
112	Gemcitabina (30)	507 ± 357 (2)	63 %	
112	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (2)	129 ± 53 (2)	91 %	
112	Gemcitabina (30) + fosfato de oseltamivir (5)	306 ± 0 (1)	78 %	

Los datos en la Tabla 12 también muestran que la monoterapia de gemcitabina a 30 mg/kg redujo significativamente el crecimiento tumoral en un tiempo hasta la progresión en el día 79 después de la implantación en 86%, en el día 84 en 89 %, en el día 93 en 69 % y en el día 112 en 63 %. Es de notar que la terapia de gemcitabina empezó a perder su efecto sobre el crecimiento tumoral por el cual el tumor empezó a volverse resistente a las acciones quimioterapéuticas de la gemcitabina, pero perdió su efecto en el día 93. La combinación de gemcitabina con fosfato de oseltamivir a las dos dosificaciones diferentes invirtió significativamente la resistencia quimioterapéutica del tumor, manteniendo una reducción de 89 % en el día 93 y 78-91 % en el día 112 después de la implantación.

Los resultados mostrados en la Figura 6 indican claramente una extensión significativa espectacular de las tasas de supervivencia de los ratones portadores de tumor por 112 días para la combinación de gemcitabina y fosfato de oseltamivir, seguido por la monoterapia de fosfato de oseltamivir en los días 91 y 94, y la combinación de Abraxane con fosfato de oseltamivir en los días 87 y 91 en comparación con los grupos de control no tratados en el día 80. La monoterapia de Abraxane a la baja dosificación de 0,5 mg/kg no tuvo efecto sobre las tasas de supervivencia de los ratones en comparación con la cohorte de control no tratada.

Los datos en la Tabla 13 indican las metástasis hepáticas como una medida del número promedio de nódulos y el tamaño de nódulos en mm en cada una de las cohortes de tratamiento anteriores. Hubo una reducción significativa en las metástasis hepáticas en más de 38 % en las cohortes tratadas en los diferentes días después de la implantación cuando se comparó con la cohorte de control no tratada. Además, la combinación de gemcitabina con fosfato de oseltamivir a 5 mg/kg redujo las metástasis hepáticas en 81 % en comparación con la cohorte de control no tratada y redujo además las metástasis hepáticas en 10 % con respecto a la monoterapia del fármaco

quimioterapéutico en el día 109 después de la implantación.

5

10

15

20

25

30

35

Tabla 13. El efecto del co-tratamiento de fosfato de oseltamivir (Tamiflu) (10 mg/kg al día) y Alimta (100 mg/kg) o Abraxane (200 mg/kg) sobre las metástasis hepáticas con células de cáncer pancreático PANC-1 implantadas en

rat	ones de x	enoinierto	NOD de	doble mu	itante F	RAG1/Cv

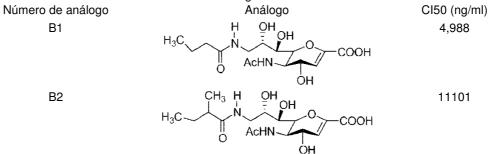
Días	Fármaco	Dosificación	Fosfato de	Metástasis	% de	Metástasis
después de la	quimioterapéutico	(mg/kg)	oseltamivir (mg/kg)	hepáticas (número	inhibición	(tamaño, mm)
implantación			(mg/ng)	promedio de		,
				nódulos)		
79	no tratado	0	0	42		0,2-1,2
90		0	2	26	38 %	0,2-1,3
90		0	5	21	50 %	0,8-0,2
78	Abraxane	0,5	0	22	48 %	0,2-1,0
78	Abraxane	0,5	2	19	55 %	0,2-0,7
90	Abraxane	0,5	5	21	50 %	0,1-1,0
101	gemcitabina	30	0	12	71 %	0,3-1,5
110	gemcitabina	30	2	10	76 %	0,5-1,2
109	gemcitabina	30	5	8	81 %	0,2-1,5

La Tabla 14 incluye datos de CI50 para la inhibición de la sialidasa Neu1 por análogos del agente antiviral ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (DANA). Los análogos de DANA se han desvelado previamente por Magesh et al. [33].

Se cultivaron células de macrófagos de BMA que expresan TLR en portaobjetos de vidrio circulares de 12 mm en medio de cultivo que contenía DMEM complementado con 10 % de suero de ternero fetal. Después de retirar el medio, se añadió sustrato de 4-MUNANA 2,04 mM [ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuramínico] (Sigma-Aldrich) en solución salina tamponada con Tris, pH 7,4, a cada portaobjetos solo (control), con dosis predeterminadas de ligando específico, o en combinación de ligando e inhibidor a diversas dosis El sustrato se hidroliza por sialidasa dando 4-metilumbeliferona libre que tiene una emisión de fluorescencia a 450 nm (color azul) tras una excitación a 365 nm. Se tomaron imágenes fluorescentes después de 2-3 minutos usando microscopía epifluorescente (Zeiss Imager M2, objetivo 40x).

Este ensayo recientemente desarrollado se usó para detectar la actividad de sialidasa sobre la superficie de células viables. La actividad de sialidasa se revela en la periferia que rodea las células usando un sustrato específico de sialidasa fluorogénica, 4-MUNANA [ácido 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuramínico], cuyo producto de escisión 4-metilumbeliferona fluoresce a 450 nm. La potencia inhibidora de una serie de análogos de DANA modificados en C9 unido a amida (ácido 2-desoxi-2,3-dehidro-D-N-acetilneuramínico) sobre la actividad de la sialidasa Neu1 inducida por el lipopolisacárido (LPS) se evaluó en células de macrófago BMA vivas. Para aclarar más la capacidad inhibidora de estos análogos de DANA, se determinó la concentración inhibidora al 50 % (CI50) de cada uno de los compuestos representando la disminución en la actividad de sialidasa frente al logaritmo de la concentración de agente. Los resultados mostrados en la Tabla 14 sugieren que los análogos de DANA que tienen cadenas laterales de alquilo lineal o cadenas laterales de alquilo cíclico de 5 o 6 miembros tienen elevada potencia inhibidora sobre la actividad de sialidasa inducida por LPS en comparación con los análogos con cadenas laterales ramificadas y con el compuesto de DANA parental. Se cree que los análogos que tienen cadenas laterales lineales o sin ramificar pueden interaccionar con el sitio activo de Neu1 más eficientemente debido a un impedimento estérico reducido en esta porción de la molécula.

Tabla 14: Actividad inhibidora de análogos de DANA sobre la sialidasa Neu1.



	(continuación)	
Número de análogo	Análogo	CI50 (ng/ml)
B3	H OH OH COOH	1,56
B4	H ₃ C OH OH OH	989,3
B5	H ₃ C OH OH OH OH	542
B6	AcHN OH COOH	29600
В7	H ₃ C N ACHN OH COOH	246174
B8	H ₃ C H OH OH OH OH	408381
B9	H OH OH COOH	400076
B10	H ₃ C CH ₃ H OH OH OH OH	153979

Basándose en los resultados de los estudios *in vivo* hasta la fecha, los hallazgos significan que la monoterapia de fosfato de oseltamivir o en co-tratamiento con fármacos quimioterapéuticos estándar previenen el crecimiento *in vivo* de dos cánceres pancreáticos humanos diferentes que usan ratones de xenoinjerto inmunodeficientes. Los hallazgos proporcionan la prueba de principio para una monoterapia de fosfato de oseltamivir eficaz o en combinación con fármacos quimioterapéuticos estándar para la prevención de (a) crecimiento de tumor pancreático humano, y (b) metástasis hepáticas. Además, la monoterapia de fosfato de oseltamivir o en combinación con fármacos quimioterapéuticos clínicos estándar tiene un potencial prometedor en el tratamiento del cáncer pancreático, particularmente en casos en los que el tumor se ha vuelto resistente a quimioterapéuticos convencionales.

10

15

20

Estos datos *in vivo*, acoplados con los datos *in vitro*, indican que la eficacia del fosfato de oseltamivir y el fosfato de oseltamivir en combinación con quimioterapéuticos convencionales proporciona soporte para el uso de fosfato de oseltamivir para el tratamiento del cáncer, en general, y además para el uso de fosfato de oseltamivir en combinación con quimioterapéuticos conocidos para el tratamiento del cáncer.

Además, los datos *in vitro* que indican la eficacia de análogos de fosfato de oseltamivir como potentes agentes contra las líneas de células cancerosas probadas indican que los análogos de fosfato de oseltamivir también se pueden usar como agentes activos en el tratamiento del cáncer. Se observa además que se encontró que los mismos análogos de fosfato de oseltamivir eran inhibidores de la sialidasa Neu1. Esta combinación con los resultados *in vitro* en los ensayos de células cancerosas indica que es probable que estos compuestos trabajen mediante la misma vía de señalización que el fosfato de oseltamivir. Basándose en esto, un experto en la materia entendería que se esperaría que los análogos adicionales de fosfato de oseltamivir que tienen actividad de sialidasa Neu1 también fueran útiles para el tratamiento del cáncer.

Adicionalmente, se entendería que otros compuestos que son inhibidores de la sialidasa Neu1 también actuarían mediante el paradigma de señalización de receptores para afectar el receptor de Trk y EGFR y posiblemente otros receptores y así se pudieran usar para tratar cáncer. Los ejemplos de dichos inhibidores de la sialidasa Neu1 son DANA y los análogos de DANA descritos como B1-B11 anteriormente.

Aunque la presente invención se describió con referencia a realizaciones específicas y ejemplos, se debe entender que la invención no se limita a los ejemplos desvelados.

10 Referencias

5

20

25

30

40

45

Las siguientes referencias se proporcionan como ejemplos de la técnica conocida referentes a la presente invención. El siguiente listado no pretende comprender una lista exhaustiva de la técnica relevante.

15 Referencias referentes a

- 1. Hudlicky, T. Processes and Intermediates for the Preparation of Oseltamivir and Analogs Thereof. WO 2009/137916
- 2. Hudlicky, T.; Wernerm L.; Machara A. Process and Compounds for the Manufacture of Oseltamivir and Analogs thereof, and New Antiviral Agents. WO 2011/047466
- 3. Jialiang H.; Van den Steen, P. E.; Qing-Xiang S. A.; Ghislain O. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. Nature Reviews I Drug Discovery, vol 6, 480-498.
- 4. Amith, S.R.; Jayanth, P.; Franchuk, S.; Siddiqui, S.; Seyrantepe, V.; Gee, K.; Basta, S.; Beyaert, R.; Pshezhetsky, A.V.; Szewczuk, M.R. Dependence of pathogen molecule-induced toll-like receptor activation and cell function on neu1 sialidase. Glycoconi J 2009, 26, 1197-1212.
- cell function on neu1 sialidase. Glycoconj J 2009, 26, 1197-1212.
 5. Takahashi, M.; Tsuda, T.; Ikeda, Y.; Honke, K.; Taniguchi, N. Role of n-glycans in growth factor signaling. Glycoconj J 2004, 20, 207-212.
- 6. Amith, S.R.; Jayanth, P.; Franchuk, S.; Finlay, T.; Seyrantepe, V.; Beyaert, R.; Pshezhetsky, A.V.; Szewczuk, M.R. Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of toll-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. Cell Signal 2010, 22, 314-324.
- 7. Woronowicz, A.; Amith, S.R.; De Vusser, K.; Laroy, W.; Contreras, R.; Basta, S.; Szewczuk, M.R. Dependence of neurotrophic factor activation of trk tyrosine kinase receptors on cellular sialidase. Glycobiology 2007, 17, 10-24.
- 8. Hata, K.; Koseki, K.; Yamaguchi, K.; Moriya, S.; Suzuki, Y.; Yingsakmongkon, S.; Hirai, G.; Sodeoka, M.; von Itzstein, M.; Miyagi, T. Limited inhibitory effects of oseltamivir and zanamivir on human sialidases. Antimicrob Agents Chemother 2008, 52, 3484-3491.
 - 9. Nan, X.; Carubelli, I.; Stamatos, N.M. Sialidase expression in activated human t lymphocytes influences production of ifn-gamma. J Leukoc Biol 2007, 81, 284-296.
 - 10. Shi, D.; Yang, J.; Yang, D.; LeCluyse, E.L.; Black, C.; You, L.; Akhlaghi, F.; Yan, B. Antiinfluenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1, and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel. J Pharmacol Exp Ther 2006, 319, 1477-1484.
 - 11. Morimoto, K.; Nakakariya, M.; Shirasaka, Y.; Kakinuma, C.; Fujita, T.; Tamai, I.; Ogihara, T. Oseltamivir (tamiflu) efflux transport at the blood-brain barrier via p-glycoprotein. Drug Metab Dispos 2008, 36, 6-9.
 - 12. Jayanth, P.; Amith, S.R.; Gee, K.; Szewczuk, M.R. Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for neurotrophin activation of trk receptors and cellular signaling. Cell Signal 2010, 22, 1193-1205.
 - 13. Amith, S.R.; Jayanth, P.; Franchuk, S.; Siddiqui, S.; Seyrantepe, V.; Gee, K.; Basta, S.; Beyaert, R.; Pshezhetsky, A.; Szewczuk, M. Dependence of pathogen molecule-induced toll-like receptor activation and cell function on neu1 sialidase. Glycoconjugate Journal 2009, 26, 1197-1212.
- 14. Amith, S.R.; Jayanth, P.; Franchuk, S.; Finlay, T.; Seyrantepe, V.; Beyaert, R.; Pshezhetsky, A.V.; Szewczuk,
 M.R. Neu1 desialylation of sialyl alpha-2,3-linked beta-galactosyl residues of toll-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. Cell Signal 2010, 22 314-324.
 - 15. Miyagi, T.; Sagawa, J.; Konno, K.; Tsuiki, S. Immunological discrimination of intralysosomal, cytosolic, and two membrane sialidases present in rat tissues. J. Biochem. (Tokyo) 1990, 107, 794-798.
- 16. Rodriguez, J.A.; Piddini, E.; Hasegawa, T.; Miyagi, T.; Dotti, C.G. Plasma membrane ganglioside sialidase regulates axonal growth and regeneration in hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. 2001, 21, 8387-8395. 17. Sasaki, A.; Hata, K.; Suzuki, S.; Sawada, M.; Wada, T.; Yamaguchi, K.; Obinata, M.; Tateno, H.; Suzuki, H.; Miyagi, T. Overexpression of plasma membrane-associated sialidase attenuates insulin signaling in transgenic mice. J. Biol. Chem. 2003, 278, 27896-27902.
- 18. Papini, N.; Anastasia, L.; Tringali, C.; Croci, G.; Bresciani, R.; Yamaguchi, K.; Miyagi, T.; Preti, A.; Prinetti, A.; Prioni, S.; Sonnino, S.; Tettamanti, G.; Venerando, B.; Monti, E. The plasma membrane-associated sialidase mmneu3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cells supporting its involvement in cell-to-cell interactions. J.Biol.Chem. 2004, 279, 16989-16995.
 - 19. Yamaguchi, K.; Hata, K.; Koseki, K.; Shiozaki, K.; Akita, H.; Wada, T.; Moriya, S.; Miyagi, T. Evidence for mitochondrial localization of a novel human sialidase (neu4). Biochem. J. 2005, 390, 85-93.
- 20. Seyrantepe, V.; Poupetova, H.; Froissart, R.; Zabot, M.T.; Maire, I.; Pshezhetsky, A.V. Molecular pathology of neu1 gene in sialidosis. Hum. Mutat. 2003, 22, 343-352.

- 21. Lukong, K.E.; Elsliger, M.A.; Chang, Y.; Richard, C.; Thomas, G.; Carey, W.; Tylki-Szymanska, A.; Czartoryska, B.; Buchholz, T.; Criado, G.R.; Palmeri, S.; Pshezhetsky, A.V. Characterization of the sialidase molecular defects in sialidosis patients suggests the structural organization of the lysosomal multienzyme complex. Hum. Mol. Genet. 2000, 9, 1075-1085.
- 22. Hinek, A.; Pshezhetsky, A.V.; Von, I.M.; Starcher, B. Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly. J.Biol.Chem. 2006, 281, 3698-3710.

 23. Liu, D.; Zhang, Y.; Dang, C.; Ma, Q.; Lee, W.; Chen, W. Sirna directed against trka sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine through an inactivation of pi3k/akt-dependent pathway. Oncol Rep 2007, 18, 673-677.
- 24. Yogalingam, G.; Bonten, E.J.; van de Vlekkert, D.; Hu, H.; Moshiach, S.; Connell, S.A.; d'Azzo, A. Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. Dev Cell 2008, 15, 74-86.
 25. Seyrantepe, V.; Iannello, A.; Liang, F.; Kanshin, E.; Jayanth, P.; Samarani, S.; Szewczuk, M.R.; Ahmad, A.; Pshezhetsky, A.V. Regulation of phagocytosis in macrophages by neuraminidase 1. Journal of Biological Chemistry 2010, 285, 206-215.
- 26. Chen, X.P.; Enioutina, E.Y.; Daynes, R.A. The control of il-4 gene expression in activated murine t lymphocytes: A novel role for neu-1 sialidase. J Immunol 1997, 158, 3070-3080.

 27. Uberall, I.; Kolar, Z.; Trojanec, R.; Berkovcova, J.; Hajduch, M. The status and role of erbb receptors in human cancer. Exp Mol Pathol 2008, 84, 79-89.
- 28. Li, D.; Ji, H.; Zaghlul, S.; McNamara, K.; Liang, M.C.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L.R.; Padera, R.F.; Scott, A.M.; Jungbluth, A.A.; Cavenee, W.K.; Old, L.J.; Demetri, G.D.; Wong, K.K. Therapeutic antiegfr antibody 806 generates responses in murine de novo egfr mutant-dependent lung carcinomas. J Clin Invest 2007, 117, 346-352.
 - 29. Takahashi, M.; Yokoe, S.; Asahi, M.; Lee, S.H.; Li, W.; Osumi, D.; Miyoshi, E.; Taniguchi, N. N-glycan of erbb family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion. Biochim Biophys Acta 2008, 1780, 520-524.
- 30. Zwick, E.; Bange, J.; Ullrich, A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. Trends Mol Med 2002, 8, 17-23.
 - 31. Arabkhari, M.; Bunda, S.; Wang, Y.; Wang, A.; Pshezhetsky, A.V.; Hinek, A. Desialylation of insulin receptors and igf-1 receptors by neuraminidase-1 controls the net proliferative response of I6 myoblasts to insulin. Glycobiology 2010, 20, 603-616.
- 30 32. Gilmour, A. M.; Jayanth, P.; Szewczuk, M. R. Ligand-Induced EGFR Activation is dependent on Neu1 Sialidase and MMP-9 Cross-Talk poster presentation 2010 Annual Conference of the Society for Glycobiology, November 7-10, 2010, St. Petersburg Beach, FL.
 - 33. Magesh, S. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Human Sialidase Inhibitors, Biorganic and Medicinal Chemistry Letters 2008, (18), 532-537.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el inhibidor de la sialidasa Neu1 es fosfato de oseltamivir, ácido 2-desoxi-2,3-dehidro-N-acetilneuramínico (DANA), o un análogo de DANA de la fórmula G

5

30

35

en donde R^{50} es alquilo C_{1-6} en donde el alquilo puede ser alifático lineal o ramificado o el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo cíclico.

2. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el análogo de DANA es

- 3. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el inhibidor de la sialidasa Neu 1 actúa mediante una vía de señalización de receptores para inhibir uno o más receptores del crecimiento implicados en el cáncer.
 - 4. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho uno o más receptores de crecimiento se seleccionan de EGFR, receptor de tipo insulina, VEGF, receptor del tipo toll, receptor de Trk A o receptor de Trk B.
 - 5. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso en el tratamiento del cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cáncer es cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario o cáncer de próstata.
 - 6. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho cáncer es cáncer pancreático.
- 7. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde 40 uno o más agentes quimioterapéuticos y dicho inhibidor de la sialidasa Neu1 se administran simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden.

- 8. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según la reivindicación 7, en donde el agente quimioterapéutico es cisplatino, cis-diaminodicloroplatino (II), fluorouracilo, gemcitabina, tamoxifeno, pemetrexed o paclitaxel unido a proteína (ABRAXANE).
- 5 9. Un inhibidor de la sialidasa Neu1 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1- 8, en donde dicho inhibidor de la sialidasa Neu1 es fosfato de oseltamivir.

- 10. Una composición farmacéutica que comprende fosfato de oseltamivir en una formulación adecuada para inyección y que comprende además un agente quimioterapéutico anticancerígeno.
- 11. Una composición farmacéutica que comprende fosfato de oseltamivir, DANA o un análogo de DANA de la fórmula G como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y que comprende además uno o más compuestos quimioterapéuticos anticancerígenos.
- 15 12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11, en donde dicho DANA o un análogo de DANA de la fórmula G está en una formulación adecuada para inyección.
- 13. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde dicho agente quimioterapéutico anticancerígeno es cisplatino, cis-diaminodicloroplatino (II), fluorouracilo, gemcitabina, tamoxifeno, pemetrexed o paclitaxel unido a proteína (ABRAXANE).

Estado de la técnica

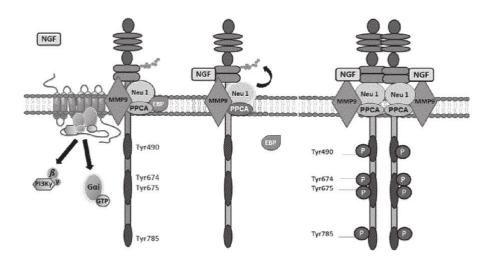


Figura 1

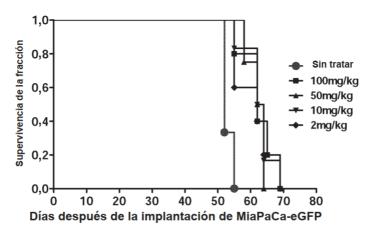


Figura 2a

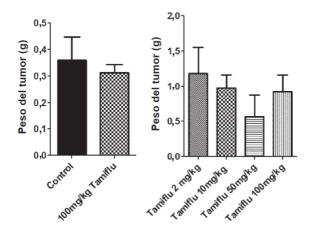


Figura 2b

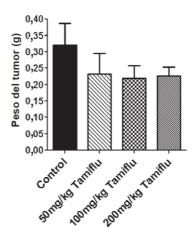
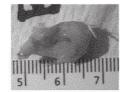


Figura 3a

Día sin tratar 47 Tamiflu (100 mg/kg) D47



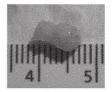


Figura 3b

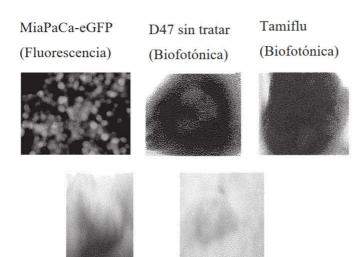
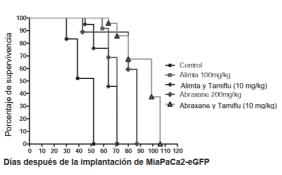


Figura 3c





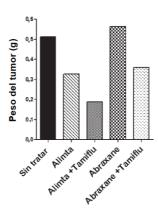


Figura 4b

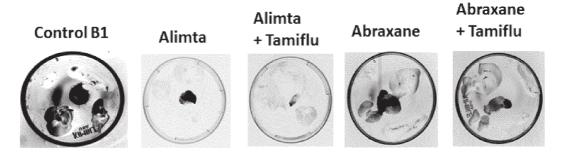


Figura 5

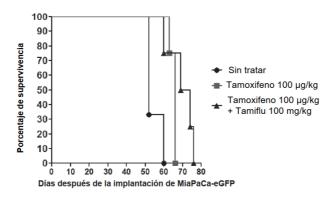


Figura 6

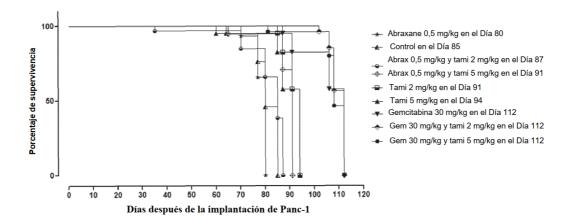


Figura 7