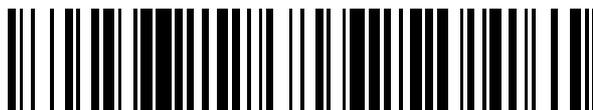


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 374**

51 Int. Cl.:

A61K 31/41 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2017 PCT/EP2017/061823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.11.2017 WO17198700**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2017 E 17726573 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3458052**

54 Título: **Tratamiento combinado de cáncer**

30 Prioridad:

17.05.2016 DK 201670325

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

01.07.2020

73 Titular/es:

**SCANDION ONCOLOGY A/S (100.0%)
Fruebjergvej 3
2100 Copenhagen Ø, DK**

72 Inventor/es:

**BRÜNNER, NILS, AAGE;
CHRISTOPHERSEN, PALLE;
STENVANG, JAN;
LICHTENBERG, JENS y
THOUGAARD, ANNEMETTE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 770 374 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento combinado de cáncer

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere al tratamiento del cáncer, en particular a los procedimientos de sensibilización de las células cancerosas a un tratamiento anticancerígeno mediante la administración de una cantidad efectiva de un modulador VRAC.

10

Antecedentes

El cáncer es una carga abrumadora para nuestra sociedad con aproximadamente 14 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2014. A pesar de la introducción de muchas nuevas modalidades/opciones de tratamiento, la resistencia *de novo* o adquirida a los tratamientos aplicados todavía representa la principal causa de muerte por

Los canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) están presentes en la mayoría de las células de mamíferos. Una función importante de VRAC es la regulación del volumen celular. Al hincharse la célula en solución hipotónica, estos canales se activan y los iones de cloruro fluyen fuera de la célula en paralelo con los iones de potasio (a través de los canales de potasio) y el agua, restaurando así el volumen celular original.

Los compuestos capaces de bloquear la actividad de VRAC se caracterizan en Helix y col., J. Membrane Biol. 196 (2003). Por ejemplo, NS3728 (Endovion; SCO-101) es un potente bloqueador de VRAC oralmente activo.

25

El documento WO 98/47879 y el documento WO 00/24707 describen moduladores de VRAC, incluido NS3728, y su uso en el tratamiento de la anemia de células falciformes.

El documento WO 2004/012733 describe moduladores de VRAC, incluido NS3728, y su uso en el tratamiento de enfermedades que responden a la terapia antiangiogénica, en particular el tratamiento antimetastásico.

30

Stenvang y col., Simposio AACR-NCI-EORTC: Objetivos moleculares y terapéutica del cáncer, 24-09-2015 describe que el compuesto disulfiram vuelve a sensibilizar las células que son resistentes a un inhibidor de topoisomerasa I (NS-38), y que NS3728 vuelve a sensibilizar las células que son resistentes a un inhibidor mitótico (doxetaxel).

35

Daudigeos-Dubus y col., PLoS One, 2015, 10 (11), e0142612, 1-20; Schmieder y col., Internat. J. Cancer, 2014, 135 (6), 1487-96; y Lu y col., OncoTargets and Therapy, 2014 (7), 2143-6 describen que el regorafenib tiene un efecto sinérgico con irinotecan y mejora su citotoxicidad.

Samalin y col., Brit. J. Cancer, 2014, 110 (5), 1148-954 y Mross y col., Eur. J. Cancer, 2007, 43 (1), 55-63 describen que sorafenib más irinotecan demostró actividad sinérgica sin mayor toxicidad.

Sun y col., J. Clin. J. Cancer, 2010, 28 (18), 2947-51 y Awada y col., Eur. J. Cancer, 2012, 48 (4), 465-74 describen el uso combinado de doxetaxel y sorafenib para el tratamiento del cáncer gástrico.

45

Pedersen y col., Internat. J. Oncol., 2014, 45, 2167-75 y Lethert y col., J. Clin. Onco., 2012, 30, (15 supl.), e11042 describen la eficacia de sorafenib para el tratamiento del cáncer de mama resistente a tamoxifeno o fulvestrant.

El documento WO 2007/104719 y el documento EP 1 526 851 describen que una serie de difenilureas, que carecen del resto tetrazolilo de NS3728, son inhibidores de VRAC y útiles para el tratamiento del cáncer y pueden usarse en combinación con un inhibidor mitótico tal como docetaxel.

Estudios anteriores han indicado un papel para VRAC en la capacidad de las células cancerosas de sufrir apoptosis y se ha demostrado que NS3728 inhibe la apoptosis mediada por cisplatino *in vitro* (Poulsen y col., Am J Physiol Cell Physiol, 2010; Sorensen y col., Am J Physiol Cell Physiol, 2016; Planells_Cases, R. y col., EMBO J., 2015).

55

El tratamiento quimioterapéutico del cáncer colorrectal metastásico (mCRC) se basa generalmente en el fármaco antimetabolito 5-fluorouracilo (5FU) combinado con el agente de unión al ADN oxaliplatino (por ejemplo, el régimen FOLFOX) o el inhibidor de topoisomerasa I irinotecan (por ejemplo, el régimen FOLFIRI) y a menudo administrado en combinación con tratamiento biológico, por ejemplo, fármacos dirigidos a EGFR o fármacos antiangiogénicos. A pesar de la eficacia de estos regímenes combinados, que han aumentado significativamente la tasa de respuesta y la supervivencia de los pacientes con mCRC (Cunningham y col., 2010; Gallagher y Kemeny, 2010), solo del 30 al 50 %

60

de los pacientes tratados muestran una respuesta objetiva a cualquiera de las terapias combinadas y la progresión del cáncer a pesar del tratamiento de quimioterapia es un resultado común (Gallagher y Kemeny, 2010; Goldberg y col., 2004). Para empeorar las cosas, la tasa de respuesta objetiva al tratamiento de quimioterapia de segunda línea de mCRC FOLFOX a pacientes tratados previamente con FOLFIRI y viceversa se reduce al 10-20 % y la respuesta

objetiva al tratamiento de tercera línea casi no existe. Por lo tanto, está claro que la resistencia a los fármacos *de novo* (preexistente) o adquirida constituyen el principal problema en el manejo de mCRC. Se pueden sacar conclusiones similares cuando se analiza el CRC primario donde una gran proporción (30-40 %) de pacientes en etapa III que reciben quimioterapia adyuvante (con mayor frecuencia FOLFOX o XELOX) presentarán recurrencia de la enfermedad después de la quimioterapia.

El cáncer de mama (BC) es una enfermedad heterogénea que también se refleja en un patrón de respuesta heterogéneo a varios tipos de quimioterapia. En el tratamiento adyuvante de BC, los fármacos más utilizados son los citotóxicos, incluidas las antraciclinas (inhibidores de la topoisomerasa 2) y los taxanos. Estos fármacos se administran con mayor frecuencia junto con ciclofosfamida. Para los pacientes con CB positivo del receptor de estrógeno, el tratamiento adyuvante con mayor frecuencia incluye antiestrógenos como inhibidores de la aromatasa, antagonistas del receptor de estrógeno (tamoxifeno y fulvestrant). Sin embargo, aproximadamente el 18-20 % de los pacientes que reciben tratamiento anticancerígeno sistémico adyuvante o neoadyuvante experimentarán una recurrencia de la enfermedad. En pacientes con BC metastásico (mBC), las tasas de respuesta a la terapia sistémica varían del 60 % en el tratamiento de primera línea con una disminución rápida al 20-25 % al alcanzar el tratamiento de 3^a a 4^a línea.

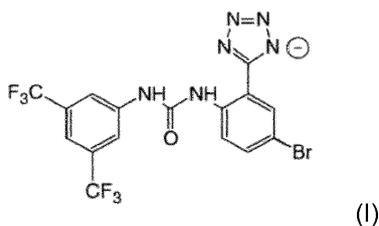
Estas cifras indican claramente un alto grado de resistencia *de novo* y resistencia adquirida que conduce a la progresión de la enfermedad y la muerte de miles de mujeres cada año.

De ello se deduce que la identificación, caracterización y validación preclínica y clínica de nuevos fármacos y combinaciones de fármacos para el tratamiento del cáncer y, en particular, el cáncer resistente a los fármacos, constituyen una necesidad médica muy insatisfecha.

Resumen

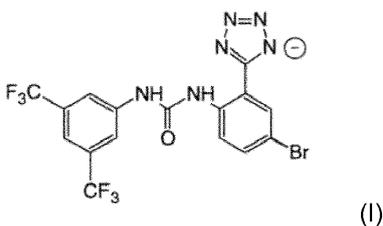
La presente invención proporciona un nuevo régimen de tratamiento para el cáncer y es particularmente adecuada para el tratamiento de cánceres resistentes a la quimioterapia. El régimen de tratamiento de la presente invención comprende el tratamiento con un compuesto capaz de modular la actividad de los canales aniónicos regulados por volumen (VRAC), es decir, el modulador VRAC Endovion (NS3728). Sorprendentemente, se ha demostrado que el tratamiento conjunto con NS3728 mejora el efecto de un tratamiento contra el cáncer. Además, se muestra que el tratamiento conjunto con NS3728 es capaz de volver a sensibilizar las células cancerosas resistentes a la quimioterapia para el tratamiento con ciertos agentes quimioterapéuticos.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un modulador VRAC de fórmula I



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un tratamiento anticancerígeno para su uso en el tratamiento del cáncer, donde el tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38 o topotecan.

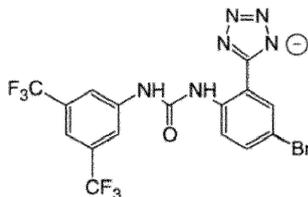
En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC de fórmula I



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un tratamiento anticancerígeno y uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, donde el tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN- 38 o topotecan.

5

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC de fórmula I

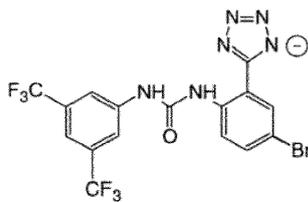


(I)

10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad efectiva de un tratamiento anticancerígeno para su uso como medicamento, donde el tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38 o topotecan.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit de piezas que comprende un modulador VRAC de fórmula I



(I)

20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un tratamiento anticancerígeno, donde el modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno están formulados para la administración simultánea, secuencial o separada y opcionalmente instrucciones de uso, donde dicho tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38, o topotecan.

25 Descripción de los dibujos

Figura 1 Efecto de las dosis diarias de NS3728 (40 mg/kg PO), temozolamida (Temodal) (25 mg/kg IP) y la combinación de las mismas en el crecimiento de xenoinjertos de glioblastoma C9 *in vivo*.

30 Figura 2 Efecto de las dosis diarias de temozolamida NS3728 (40 mg/kg) (Temodal) (5 mg/kg IP), y la combinación de las mismas en el crecimiento de células de glioblastoma C9 en el modelo de saco de aire subcutáneo (SAS) *in vivo*.

Figura 3 Efecto de NS3728 (80 mg/kg, PO), 5-flourouracilo (30 mg/kg, IP) y la combinación de los mismos en el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon HT29 en comparación con ratones tratados con vehículo *in vivo*.

35

Figura 4 Efecto de NS3728 (80 mg/kg, PO), paclitaxel (5 mg/kg, IP) y la combinación de los mismos en el crecimiento de xenoinjertos de tumor de colon HT29 en comparación con ratones tratados con vehículo *in vivo*.

Figura 5 Efecto de NS3728, docetaxel y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células de 40 cáncer de mama MCF7 resistentes a docetaxel *in vitro* Las barras de error son desviaciones estándar.

Figura 6 Efecto de NS3728, docetaxel y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 resistentes a docetaxel *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

45 Figura 7 Efecto de NS3728, oxalipatina y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas parentales HCT116 CRC *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

Figura 8 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas

parentales HCT116 CRC *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

Figura 9 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas parentales HT29 CRC *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

5

Figura 10 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas parentales LoVo CRC *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

Figura 11 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas HCT116 CRC resistentes a SN-38 *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

10

Figura 12 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas HT29 CRC resistentes a SN-38 *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

Figura 13 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas LoVo CRC resistentes a SN-38 *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

15

Figura 14 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas HT29 CRC resistentes a oxaliplatino *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

20

Figura 15 Efecto de NS3728, SN-38 y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas LoVo CRC resistentes a oxaliplatino *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

Figura 16 Efecto de NS3728, tamoxifeno y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células de cáncer de mama MCF7/LCC2 resistentes a tamoxifeno *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

25

Figura 17 Efecto de NS3728, ICI182,780 (Fulvestrant/Faslodex) y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de células de cáncer de mama MCF7/LCC9 resistentes a ICI182,780 *in vitro*. Las barras de error son desviaciones estándar.

30

Descripción detallada

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

35

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el tratamiento conjunto del cáncer con un modulador VRAC y una terapia anticancerígena, como un agente quimioterapéutico, ha aumentado la eficacia en comparación con la monoterapia, y además sensibiliza nuevamente las células cancerosas quimiorresistentes al tratamiento, y por lo tanto proponen un nuevo régimen de tratamiento para el cáncer donde se administra un modulador VRAC para potenciar el efecto terapéutico de un tratamiento anticancerígeno y/o sensibilizar las células cancerosas al tratamiento anticancerígeno.

40

VRAC

Los canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) están presentes en la mayoría de las células de mamíferos. Una función importante de VRAC es la regulación del volumen celular: Al hincharse la célula en solución hipotónica, estos canales se activan y los iones de cloruro fluyen fuera de la célula en paralelo con los iones de potasio (a través de los canales de potasio) y el agua, restaurando así el volumen celular original.

45

La familia de genes que codifica los VRAC fue identificada esencialmente simultáneamente por dos grupos independientes en 2014 como la familia LRRC8 (Voss y col, 2014, Science 344 (6184): 634-8 y Qui y col, 2014, Cell 157 (2): 447-58). VRAC también se ha conocido históricamente en la bibliografía como canal de anión de osmolito orgánico sensible al volumen (VSOAC), rectificador externo sensible al volumen (VSOR), canal de anión dependiente del voltaje (VDAC), rectificador externo sensible al volumen humano (HSVOR), canal de cloruro regulado por volumen (VRCIC) e I_{Cl} de hinchamiento. Actualmente se supone que estas manifestaciones fenotípicas son el resultado de diferentes composiciones de subunidades LRRC8 en el VRAC funcional expresado en diferentes tipos de células.

55

El VRAC es un canal aniónico distribuido de forma casi ubicua, que se activa por la inflamación celular y/o una disminución de la fuerza iónica intracelular. Es el canal que media el aumento de la conductancia aniónica durante la disminución del volumen regulatorio (RVD). En los registros electrofisiológicos, el VRAC muestra rectificación externa y en la mayoría de las células una pronunciada inactivación dependiente del voltaje a potenciales de membrana positivos. VRAC es altamente anión selectivo con una secuencia de selectividad única para pequeños iones

60

inorgánicos: SCN^- , I^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- , HCO_3^- , F^- (secuencia de selectividad de haluro de Eisenman tipo I) y, -que dependen de la composición de la subunidad específica, - que tienen un poro ancho que también permite la penetración de una gran cantidad de moléculas orgánicas cargadas negativamente o neutras como el cisplatino.

- 5 La activación de VRAC es obligatoria dependiendo de la presencia de ATP intracelular y las complejas cascadas de señalización intracelular que involucran proteínas quinasas apoyan el procedimiento de activación.

Bloqueador VRAC

- 10 El modulador VRAC es un bloqueador VRAC. El término "bloqueador de VRAC" se usa indistintamente en esta invención con el término "inhibidor de VRAC". Un bloqueador VRAC es un compuesto que inhibe el transporte transmembrana de cloruro o cualquier otro anión o molécula neutra en respuesta al hinchamiento celular o la disminución de la fuerza iónica intracelular.

- 15 Un compuesto que actúa como un inhibidor de VRAC se une a la proteína del canal y ejerce su efecto inhibitor discernible a través de uno o más de los procedimientos de medición de la función VRAC como se describe en esta invención. Los compuestos inhibidores pueden actuar a través de uno o más modos de acción teóricos (MOA), cuyos principales grupos son:

- 20 1) Una forma de obtener la inhibición es obstruyendo directamente (bloqueando) el flujo de corriente a través del canal abierto uniéndose en algún lugar de la región de poros transmembrana del canal. Dichas moléculas a veces se denominan "bloqueadores" en la técnica.

- 2) Otra forma, mucho más heterogénea, de obtener la inhibición es impedir o retrasar los procedimientos de activación natural del canal y/o estimulando/acelerando sus procedimientos de inactivación o desactivación naturales. En general, se espera que tales moléculas den como resultado una probabilidad reducida de encontrar una proteína de canal individual en su configuración abierta (probabilidad de estado abierto reducida, P_o). Dichas moléculas pueden mencionarse colectivamente como "moduladores de activación negativa", sin importar en qué procedimientos microscópicos influyan. Un modulador de activación negativa también se denomina a veces "modulador alostérico negativo" o "NAM".

- 30 La elucidación del MOA detallado para un compuesto particular es una tarea muy difícil y puede requerir la combinación de mediciones funcionales de alta sensibilidad (por ejemplo, grabaciones de un solo canal como se menciona en esta invención) e información estructural de alta resolución (por ejemplo, cristalografía, análisis de secuencias, análisis de mutagénesis etc.) En el presente caso, no se determina inequívocamente qué MOA son responsables de los efectos
35 inhibidores de VRAC de los moduladores de VRAC mencionados en esta invención. Por lo tanto, se denominan colectivamente bloqueadores VRAC.

El potencial de una sustancia determinada para actuar como un bloqueador VRAC puede determinarse utilizando procedimientos de prueba de laboratorio estándar, como

- 40 a) tecnología de pinza de parche de célula completa o de un solo canal, o las versiones automáticas de HTC de la misma
b) electrofisiología de microelectrodos (electrodos penetrantes y afilados),
c) ensayos de flujo (por ejemplo, isótopos radiactivos y no radiactivos),
d) colorantes fluorescentes (por ejemplo, potencial de membrana o indicadores de concentración de cloruro),
45 e) mediciones de volumen celular (por ejemplo, dispersión de luz, mediciones de contador de rejillas o procedimientos ópticos como el análisis de imágenes).

- Para medir la actividad VRAC es necesario activar la proteína del canal hinchando la célula (por ejemplo, por exposición a una solución de Ringer extracelular hipotónica) o haciendo que la solución intracelular sea hipertónica o
50 de baja fuerza iónica (solo algunas tecnologías lo permiten, es decir, la pinza de parche de célula completa se describe en 1.a a continuación)

- La actividad VRAC se registra más directamente por procedimientos electrofisiológicos que permiten mediciones directas de la corriente de anión transmembrana activada por hinchamiento a un potencial de membrana fijo (pinza de
55 voltaje). Las posibilidades son:

Técnicas manuales

- a) Pinza de parche de célula completa manual (medición de la corriente de aniones de toda la membrana celular).
60 Esta es la configuración más realista para la detección de fármacos. La configuración unida a la célula (medición de la corriente a través de relativamente pocos canales iónicos expresados en una pequeña parte de la membrana celular) se ha utilizado en algunos casos en la bibliografía, y lo mismo cuenta para las configuraciones extirpadas, donde los

fragmentos de membrana han sido aislados en la punta de la pipeta de parche (configuraciones de adentro hacia afuera y afuera). Estos procedimientos son principalmente relevantes en investigaciones biofísicas o en el esclarecimiento del modo de acción de compuestos específicos (bajo rendimiento).

- 5 b) Grabaciones de parches perforados (esencialmente la misma configuración que la configuración de la célula completa descrita en 1a, con la diferencia de que no se ha establecido un agujero en la membrana, sin embargo, una conexión de baja resistencia al interior de la célula mediante el uso de agentes permeabilizantes (típicamente péptidos bacterianos formadores de poros, como la anfotericina B). El rendimiento es considerablemente más bajo que el procedimiento de células completas, pero tiene la ventaja de mantener el medio celular más cerca de la composición fisiológica durante el registro. (En el contexto de VRAC, que depende del ATP intracelular, esta molécula no necesita aplicarse a la solución de pipeta como lo ha hecho en toda la configuración celular).
- 10 c) Electrofisiología "clásica" manual utilizando electrodos penetrantes de membrana "afilados". No se implementa fácilmente para la detección de fármacos, ya que el procedimiento es muy difícil de usar con líneas celulares de laboratorio pequeñas típicas (HEK, CHO, etc.)

15 Técnicas automáticas

- d) Diversas formas de electrofisiología HTS, que hoy se ejemplifica con QPatch o QUBE de Sophion Bioscience (Korsgaard, MP y col., Comb Chem High Throughput Screen, 2009; Chambers, C y col., Assay Drug Dev Technol., 2016) o los sistemas Nanion. Básicamente, todos los procedimientos realizan mediciones de células completas (véase a) o mediciones de parches perforados (véase b) utilizando un sustrato de vidrio plano o silicio montado en un chip, lo que permite un alto grado de automatización de las mediciones y el manejo de compuestos/fluidos en un conjunto paralelo arriba.

Se pueden medir más efectos indirectos de la activación de VRAC mediante:

- 25 a) Expresión (estable, transitoria o inducible) de una proteína o péptido fluorescente sensible al haluro en la célula en cuestión (es decir, HEK293). La más utilizada es la proteína fluorescente amarilla (YFP), cuya emisión de luz es extremadamente sensible al tipo y concentración de haluros en el medio. En este contexto, se aprovecha que el efecto del ion yoduro es mucho más pronunciado que el ion cloro. Al aplicar iones de yoduro (que son más permeables a través de VRAC que los iones Cl) a la solución extracelular, se logra que estos pasen la membrana al interior de la célula cuando VRAC se abre (en la dirección opuesta de los iones de cloro que salen de la célula). De este modo, la activación de VRAC se informa por el aumento de la emisión de luz de YFP. Se espera que los inhibidores de VRAC amortigüen esta emisión (menos flujo de iones de yoduro) y, por lo tanto, el procedimiento puede usarse para cuantificar la potencia y el grado de inhibición.
- 30 b) El grado de hinchamiento de las células que expresan VRAC puede seguirse directamente midiendo el tamaño de la célula, por ejemplo mediante un contador de rejillas, técnicas de dispersión de luz, técnicas microscópicas o mediciones de impedancia. La inhibición de VRAC no afectará el procedimiento de hinchazón, pero impedirá o retrasará el procedimiento de recuperación de volumen llamado RVD (disminución del volumen regulatorio) que es impulsado por la activación de VRAC. Es importante darse cuenta de que al medir tanto el YFP como el tamaño de la célula, uno se basa cada vez más en los efectos indirectos "aguas abajo" de la activación de VRAC, lo que aumenta significativamente el riesgo de registrar señales tanto falsas positivas como falsas negativas. Tales resultados, por lo tanto, generalmente se validan mediante el uso de mediciones electrofisiológicas.
- 40 c) Se pueden acoplar muchos otros procedimientos a la activación de VRAC, pero estos son aún más indirectos. Los efectos en los ensayos de migración, proliferación, citotoxicidad, apoptosis en líneas celulares especiales pueden ser importantes por derecho propio con respecto a la predicción de los efectos del cáncer in vivo, pero ninguno depende únicamente del VRAC.
- 45

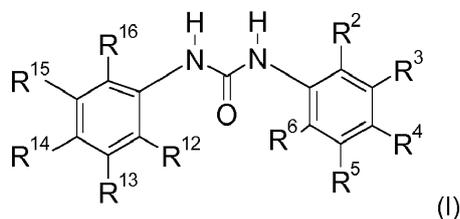
La expresión de VRAC se puede medir, por ejemplo, mediante qPCR, hibridación in situ o anticuerpos.

- Los bloqueadores VRAC que son derivados de difenilurea se describen en el documento WO 98/47879 y/o el documento WO 00/24707.
- 50

En una realización de la presente descripción, los bloqueadores VRAC muestran valores de CI50 de menos de 10 μM , tal como menos de 1000 nM, por ejemplo menos de 100 nM, tal como menos de 50 nM, por ejemplo menos de 10 nM para inhibición in vitro según los procedimientos de prueba estándar.

- 55 En una realización de la presente descripción, el bloqueador VRAC tiene una CI50 de 5 μM o menos, tal como 3 μM o menos, por ejemplo 1 μM o menos, tal como 0,5 μM o menos, por ejemplo 0,1 μM o menos, tal como 10 nM o menos, por ejemplo 5 nM o menos.
- 60 En una realización de la presente descripción, el bloqueador VRAC tiene una CI50 de 2 μM o menos, tal como 1 μM o menos, tal como 0,5 μM o menos, por ejemplo 0,1 μM o menos, tal como 10 nM o menos, por ejemplo 5 nM o menos. En una realización preferida de la presente descripción, el bloqueador VRAC tiene una CI50 de 0,5 μM o menos.

Un ejemplo de un bloqueador VRAC es un compuesto de fórmula general I



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

donde R² representa tetrazolilo; y

R³, R⁴, R⁵, R⁶, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ independientemente entre sí representan hidrógeno, halo, trifluorometilo, nitro, alquilo, alquilcarbonilo, -NR^aR^b, -NR^a-CO-R^b fenilo o heteroarilo;

10 cuyo fenilo está opcionalmente sustituido con halo, trifluorometilo, nitro, -CO-NHR^c, -COO-R^c o -CO-NR'R";

donde R^c es hidrógeno, alquilo o fenilo;

R' y R" independientemente entre sí son hidrógeno o alquilo, o

R' y R" junto con el nitrógeno al que están unidos forman un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros, cuyo anillo puede comprender opcionalmente como un miembro del anillo, un átomo de oxígeno y/o un átomo de nitrógeno adicional,

15 y/o un doble enlace carbono-carbono, y/o un doble enlace carbono-nitrógeno;

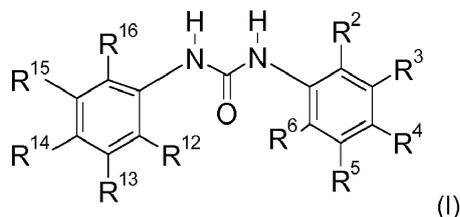
y cuyo anillo heterocíclico puede estar opcionalmente sustituido con alquilo;

R^a y R^b independientemente entre sí son hidrógeno o alquilo; o

R¹⁵ y R¹⁶ o R¹⁴ y R¹⁵ junto con el anillo de fenilo al que están unidos forman un anillo de naftilo o un anillo de indanilo; y R³, R⁴, R⁵, R⁶, R¹² y R¹³ y el resto de R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ son como se definieron anteriormente.

20

Un ejemplo de un bloqueador VRAC es un compuesto de fórmula general I



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

donde R² representa tetrazolilo;

R³, R⁴, R⁵, R⁶, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ independientemente entre sí representan hidrógeno, halo, trifluorometilo, nitro o fenilo;

cuyo fenilo está opcionalmente sustituido con halo, trifluorometilo, nitro o -CO-NHR^c; donde R^c es hidrógeno, alquilo

30 o fenilo.

En una realización de la presente descripción, el compuesto de fórmula general I, R² representa tetrazolilo; R³, R⁴, R⁵, R⁶, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ independientemente entre sí representan hidrógeno, halo, trifluorometilo o nitro.

35 En una realización de la presente descripción, el compuesto de fórmula general I, R³, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno; y R⁴ representa halo, como el bromo.

En una realización de la presente descripción, el compuesto de fórmula general I, R³, R⁴, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno.

40

En una realización adicional de la presente descripción del compuesto de fórmula general I, R³, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno; y R⁴ representa -NR^aR^b, como amino.

En otra realización adicional de la presente descripción del compuesto de fórmula general I, R³, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno; y R⁴ representa -NR^a-CO-R^b, como el acetilamino.

45

En una realización adicional de la presente descripción del compuesto de fórmula general I, R³, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno; y R⁴ representa fenilo sustituido con trifluorometilo, nitro o -CO-NHR^c; donde R^c es fenilo En una

realización especial de la presente descripción, R⁴ representa fenilo sustituido con trifluorometilo, tal como 4-trifluorometilfenilo. En una realización adicional de la presente descripción, R⁴ representa fenilo sustituido con nitro, tal como 3-nitrofenilo. En una realización adicional de la presente descripción, R⁴ representa fenilo sustituido con -CO-NHR^c, tal como anilincarbonilfenilo, en particular 4-anilincarbonilfenilo.

5 En una realización adicional de la presente descripción del compuesto de fórmula general I, R³, R⁵ y R⁶ representan hidrógeno; y R⁴ representa fenilo sustituido con -CO-OR^c o -CO-NR'R". En una realización especial de la presente descripción, R⁴ representa fenilo sustituido con -CO-OR^c, donde R^c es hidrógeno. En una realización especial de la presente descripción, R⁴ representa fenilo sustituido con -CO-NR'R", tal como 4-dimetilcarbamoilfenilo o 4-(4-metil-1-piperazina-carbonil)-fenilo.

10 En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁵ representa trifluorometilo. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁵ representa trifluorometilo y R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁶ representan hidrógeno. En una realización adicional de la presente descripción R¹³ representa trifluorometilo. En una realización especial de la presente descripción, R¹³ y R¹⁵ representan trifluorometilo y R¹², R¹⁴ y R¹⁶ representan hidrógeno.

15 En una realización adicional de la presente descripción, R¹⁶ representa trifluorometilo. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁶ representa trifluorometilo y R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ representan hidrógeno.

20 En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁵ representa halo, como cloro o bromo. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁵ representa halo, como cloro o bromo, y R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁶ representan hidrógeno. En una realización adicional de la presente descripción, R¹³ y R¹⁵ representan halo, como cloro, y R¹², R¹⁴ y R¹⁶ representan hidrógeno. En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁴ y R¹⁵ representan halo, como cloro, y R¹², R¹³ y R¹⁶ representan hidrógeno.

25 En una realización adicional de la presente descripción, R¹⁶ representa halo, como el fluoro. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁶ representa halo, como fluoro, y R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ representan hidrógeno.

30 En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁶ representa alquilo, tal como metilo o etilo. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁶ representa alquilo, tal como metilo o etilo, y R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ representan hidrógeno.

35 En una realización adicional de la presente descripción, R¹⁴ representa nitro. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁴ representa nitro y R¹², R¹³, R¹⁵ y R¹⁶ representan hidrógeno.

En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁴ representa alquilcarbonilo, tal como acetilo. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁴ representa alquilcarbonilo, tal como acetilo, y R¹², R¹³, R¹⁵ y R¹⁶ representan hidrógeno.

40 En una realización adicional de la presente descripción, R¹⁵ representa fenilo. En una realización adicional de la presente descripción, R¹⁴ representa fenilo. En una realización especial de la presente descripción, uno de R¹⁴ o R¹⁵ representa fenilo y el resto de R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ y R¹⁶ representan hidrógeno.

45 En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁵ representa piridilo, tal como piridin-3-ilo. En una realización especial de la presente descripción, R¹⁵ representa piridilo, como piridin-3-ilo, y R¹², R¹³, R¹⁴ y R¹⁶ representan hidrógeno.

En una realización adicional de la presente descripción, R¹⁵ y R¹⁶ junto con el anillo de fenilo al que están unidos forman un anillo de naftilo.

50 En otra realización adicional de la presente descripción, R¹⁴ y R¹⁵ junto con el anillo de fenilo al que están unidos forman un anillo de indanilo.

En una realización adicional de la presente descripción, el compuesto de fórmula general I se selecciona de entre

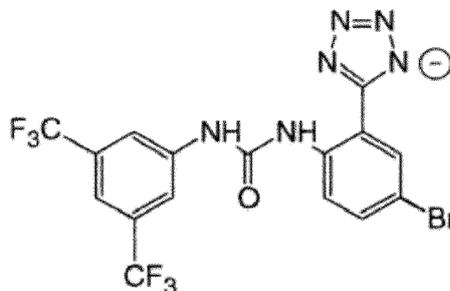
- 55 N-4-nitrofenil-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 N-3,5-di(trifluorometil)fenil-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 N-3-trifluorometilfenil-N'-[4-(3-nitrofenil)-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 N-3-trifluorometilfenil-N'-[4-(4-anilincarbonilfenil)-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 N-3-trifluorometilfenil-N'-[4-(4-trifluorometilfenil)-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 60 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'-[2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'-[4-bromo-2-(1-H-terazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'-[4-fenil-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;

- N-(3-cloro-fenil)-N'- [2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'- [4-amino-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'-[4-acetilamino-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'- [4-carbamoil-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 5 N-(3-trifluorometil-fenil)-N'- [4-(N", N"-dimetilcarbamoil)-2-(1-H-tetrazol-5-il) -fenil] urea;
 ácido 3'-(1-H-tetrazol-5-il)-4'-[3-(3-trifluorometil-fenil)-ureido]-bifenil-4-carboxílico;
 N-(indan-5-il)-N'-[2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(bifenil-4-il)-N'-[2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(bifenil-3-il)-N'-[2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 10 N-(3-acetil-fenil)-N'-[2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(bifenil-3-il)-N'-[2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-[3-(piridin-3-il)-fenil]-N'- [2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(3-bromo-fenil)-N'-[4'-(4-metil-piperazina-1-carbonil)-3-(1-H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-il]urea;
 N-(3,5-dicloro-fenil)-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 15 N-(3,4-dicloro-fenil)-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(naftalen-1-il)-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(2-trifluorometil-fenil)-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(2-fluoro-fenil)-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 N-(2-etil-fenil)-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)-fenil]urea;
 20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización especial de la presente descripción, el compuesto es

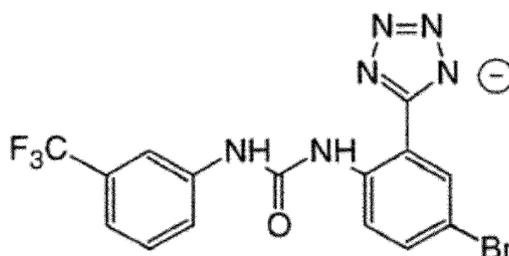
- N-4-nitrofenil-N'- [4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il) fenil]urea;
 N-3,5-di(trifluorometil)fenil-N'-[4-bromo-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 25 N-3-trifluorometilfenil-N'-[4-(3-nitrofenil)-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 N-3-trifluorometilfenil-N'-[4-(4-anilincarbonilfenil)-2-(1-H-tetrazol-5-il)fenil]urea;
 N-3-trifluorometilfenil-N'-[4-(4-trifluorometilfenil)-2-(1-H-tetrazol-5-il) fenil]urea;
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

- 30 El bloqueador VRAC de la presente invención es NS3728:



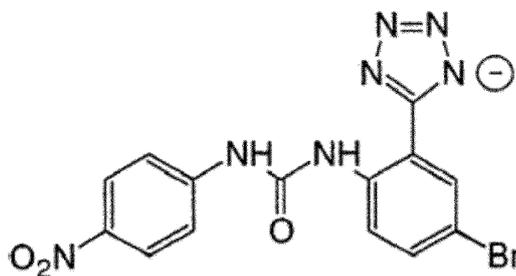
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. NS3728 también se conoce como Endovion y SCO-101. NS3728
 35 es un potente bloqueador VRAC oralmente activo con una CI_{50} de 0,40 μM (Helix y col., J Membrane Biol. 196, 2003).

También se describe en esta invención el bloqueador VRAC NS3623:



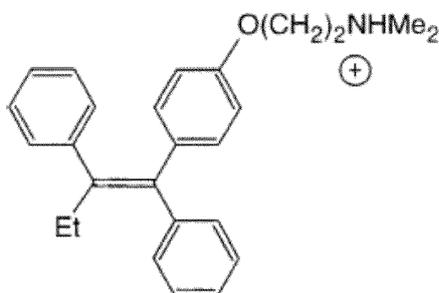
- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. NS3623 es un bloqueador VRAC con una CI_{50} de 1,8 μM (Helix y col., J Membrane Biol. 196, 2003).

También se describe en esta invención el bloqueador VRAC NS3749:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. NS3749 es un bloqueador VRAC con una CI_{50} de $1,4 \mu M$ (Helix y col., J Membrane Biol. 196, 2003).

También se describe en esta invención el bloqueador VRAC tamoxifeno (TMX):



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El tamoxifeno es un medicamento que se usa para prevenir el cáncer de mama en mujeres y tratar el cáncer de mama en mujeres y hombres. También se está estudiando para otros tipos de cáncer. El tamoxifeno es un bloqueador de VRAC dependiente del voltaje con una $CI_{50} = 2,2 \mu M$ (Helix y col., J Membrane Biol. 196, 2003).

15

En una realización de la presente descripción, el bloqueador VRAC no es tamoxifeno. En particular, cuando el tratamiento contra el cáncer es un antiestrógeno, más particularmente tamoxifeno, el bloqueador VRAC no es tamoxifeno.

20 Otros ejemplos de bloqueadores VRAC incluyen DIDS ($CI_{50} = 26 \mu M$) y NPPB ($CI_{50} = 21 \mu M$) (Helix y col., J Membrane Biol. 196, 2003).

Otros moduladores VRAC se describen en el documento EP 2 919 009.

25 **Definición de sustituyentes**

En el contexto de la presente descripción, halo representa fluoro, cloro, bromo o yodo.

En el contexto de la presente descripción, un grupo alquilo designa una cadena de hidrocarburo univalente saturada, lineal o ramificada. La cadena de hidrocarburos contiene preferentemente de uno a seis átomos de carbono (alquilo C_{1-6}), incluidos pentilo, isopentilo, neopentilo, pentilo terciario, hexilo e isohexilo. En una realización de la presente descripción, alquilo representa un grupo alquilo C_{1-4} , incluidos butilo, isobutilo, butilo secundario y butilo terciario. En otra realización de esta descripción, alquilo representa un grupo alquilo C_{1-3} , que en particular puede ser metilo, etilo, propilo o isopropilo.

35

En el contexto de la presente descripción, un grupo heteroarilo designa un grupo mono-, bi- o poli-heterocíclico aromático, que contiene uno o más heteroátomos en su estructura de anillo. Los heteroátomos preferidos incluyen nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S). Los grupos heteroarilo monocíclicos preferidos de la descripción incluyen grupos monocíclicos heterocíclicos aromáticos de 5 y 6 miembros, que incluyen furanilo, en particular 2 o 3-furanilo; tienilo, en particular 2 o 3-tienilo; pirrolilo (azolilo), en particular 1,2 o 3-pirrolilo; oxazolilo, en particular oxazol-2,4 o 5-ilo; tiazolilo, en particular tiazol-2,4 o 5-ilo; imidazolilo, en particular 1,2 o 4-imidazolilo; pirazolilo, en particular 1,3 o 4-pirazolilo; isoxazolilo, en particular isoxazol-3,4 o 5-ilo; isotiazolilo, en particular isotiazol-3,4 o 5-ilo; oxadiazolilo, en particular 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5- o 1,3,4-oxadiazol-3,4 o 5-ilo; triazolilo, en particular 1,2,3-, 1,2,4-, 2,1,3- o 4,1,2-triazolilo;

40

tiadiazolilo, en particular tiadiazol-3,4 o 5-ilo; piridinilo, en particular 2,3 o 4-piridinilo; piridazinilo, en particular 3 o 4-piridazinilo; pirimidinilo, en particular 2,4 o 5-pirimidinilo; pirazinilo, en particular 2 o 3-pirazinilo; y triazinilo, en particular 1,2, 3-, 1,2,4- o 1,3,5-triazinilo.

- 5 Los anillos heterocíclicos de 5 a 7 miembros que comprenden un átomo de nitrógeno incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, piperidina, piperidina, homopiperidina, pirrolina, tetrahidropiridina, pirazolidina, imidazolidina, piperazina, homopiperazina y morfina.

Sales farmacéuticamente aceptables

- 10 El bloqueador VRAC como se describe en esta invención puede proporcionarse en cualquier forma adecuada para la administración prevista. Las formas adecuadas incluyen sales farmacéuticamente (es decir, fisiológicamente) aceptables y formas pre o profármacos.
- 15 Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos no tóxicos tales como el hidrocloruro derivado del ácido clorhídrico, el hidrobromuro derivado del ácido bromhídrico, el nitrato derivado del ácido nítrico, el perclorato derivado del ácido perclórico, el fosfato derivado del ácido fosfórico, el sulfato derivado del ácido sulfúrico, el formiato derivado del ácido fórmico, el acetato derivado del ácido acético, el aconato derivado del ácido aconítico, el ascorbato derivado del ácido ascórbico, el
- 20 bencenosulfonato derivado del ácido bencensulfónico, el benzoato derivado del ácido benzoico, el cinamato derivado del ácido cinámico, el citrato derivado del ácido cítrico, el embonato derivado del ácido embónico, el enantato derivado del ácido enántico, el fumarato derivado del ácido fumárico, el glutamato derivado del ácido glutámico, el glicolato derivado del ácido glicólico, el lactato derivado del ácido láctico, el maleato derivado del ácido maleico, el malonato derivado del ácido malónico, el mandelato derivado del ácido mandélico, el metanosulfonato derivado del ácido
- 25 metanosulfónico, el naftaleno-2-sulfonato derivado del ácido naftaleno-2-sulfónico, el ftalato derivado del ácido ftálico, el salicilato derivado del ácido salicílico, el sorbato derivado del ácido sórbico, el estearato derivado del ácido esteárico, el succinato derivado del ácido succínico, el tartrato derivado del ácido tartárico, el tolueno-p-sulfonato derivado del ácido p-toluenosulfónico y similares. Dichas sales pueden formarse mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica.
- 30 Otros ácidos tales como el ácido oxálico, que pueden no considerarse farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de un compuesto químico para su uso según la descripción y su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.
- 35 Los ejemplos de sales catiónicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto químico de la descripción incluyen, sin limitación, el sodio, el potasio, el calcio, el magnesio, el zinc, el aluminio, el litio, la colina, la lisina y la sal de amonio, y similares, de un compuesto químico de la descripción que contiene un grupo aniónico. Dichas sales catiónicas pueden formarse mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica. En el contexto de esta descripción, las "sales de onio" de los compuestos que contienen N también se contemplan como sales farmacéuticamente
- 40 aceptables (sales de azaonio). Las sales de azaonio preferidas incluyen las sales de alquilonio, en particular las sales de metil y etilonio; las sales de cicloalquil-onio, en particular las sales de ciclopropil-onio; y las sales de cicloalquilalquil-onio, en particular las sales de ciclopropil-metil-onio.

Composiciones farmacéuticas

- 45 En una realización, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC y un agente quimioterapéutico.
- Si bien el bloqueador VRAC y/o el agente quimioterapéutico como se describe en esta invención pueden administrarse
- 50 en forma de los compuestos químicos de partida, se prefiere introducir el ingrediente activo, opcionalmente en forma de una sal fisiológicamente aceptable, en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones, diluyentes y/u otros auxiliares farmacéuticos habituales.
- En una realización, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el bloqueador
- 55 VRAC según la descripción, o una sal o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables del mismo, y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos conocidos y usado en la técnica. El(los) vehículo(s) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. En una realización adicional, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden más de un compuesto o profármaco
- 60 para su uso según la descripción, tales como dos compuestos o profármacos diferentes para su uso según la descripción.

- Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden ser aquellas adecuadas para la administración por vía oral, rectal, bronquial, nasal, pulmonar, tópica (incluyendo bucal y sublingual), transdérmica, vaginal o parenteral (incluyendo cutánea, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intracerebral, inyección intraocular o infusión), o aquellas en una forma adecuada para la administración por inhalación o insuflación, incluidos
- 5 los polvos y la administración de aerosoles líquidos, o por sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el compuesto de la descripción, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas.
- 10 El bloqueador VRAC de la descripción, junto con un adyuvante, vehículo o diluyente convencional, puede colocarse así en forma de composiciones farmacéuticas y dosis unitarias de las mismas. Dichas formas incluyen sólidos, y en particular comprimidos, cápsulas rellenas, polvo y pastillas, y líquidos, en particular soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones, elixires y cápsulas rellenas con las mismas, todo para su uso oral, supositorios para la administración por vía rectal y soluciones inyectables estériles para su uso parenteral. Dichas composiciones
- 15 farmacéuticas y sus formas de dosificación unitarias pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas de dosificación unitarias pueden contener cualquier cantidad efectiva adecuada del ingrediente activo acorde con el intervalo de dosificación diario previsto para ser empleado.
- 20 El bloqueador VRAC como se describe en esta invención puede administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación oral y parenteral.

Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de un compuesto químico de la presente descripción, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos,

25 comprimidos, píldoras, cápsulas, obleas, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que pueden actuar también como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos o un material de encapsulación. En el caso de los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido.

30 En el caso de los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad de unión necesaria en proporciones adecuadas y se comprime en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferentemente del cinco o diez a aproximadamente el setenta por ciento del compuesto activo. Los vehículos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina,

35 almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera con bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con un material encapsulante como vehículo que proporcione una cápsula en la que el componente activo, con otros vehículos o no, quede rodeado por un vehículo que, de esta manera, esté asociado con el mismo. De igual modo, las obleas y las pastillas para chupar también están comprendidas. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, obleas y pastillas

40 para chupar se pueden utilizar como formas sólidas adecuadas para la administración por vía oral.

Para preparar supositorios, en primer lugar se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como, una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao y el componente activo se dispersa homogéneamente en la misma, por ejemplo, agitando. A continuación, se vierte la mezcla homogénea fundida en moldes de un tamaño conveniente,

45 se deja enfriar y solidificar de ese modo.

Las composiciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles que contienen además del ingrediente activo los vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

50 Las preparaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua-propilenglicol. Por ejemplo, las preparaciones líquidas para la inyección parenteral se pueden formular como soluciones en solución acuosa de polietilenglicol. El bloqueador VRAC según la presente descripción puede formularse así para la administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua) y

55 puede presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes de múltiples dosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el bloqueador VRAC puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización de la solución, para constituir

60 con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso. Se pueden preparar soluciones acuosas adecuadas para su uso oral, disolviendo el componente activo en agua y añadiendo los colorantes, saborizantes, estabilizantes y agentes espesantes adecuados que se desee.

Se pueden preparar suspensiones acuosas adecuadas para la administración por vía oral, mediante la dispersión del componente activo finamente dividido en agua junto con un material viscoso, tal como, gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión conocidos.

5 También se incluyen preparaciones en forma sólida, destinadas a la conversión poco antes de su uso en preparaciones en forma líquida para la administración por vía oral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Además del componente activo, tales preparaciones pueden comprender colorantes, sabores, estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y
10 similares.

Para la administración por vía tópica a la epidermis, el bloqueador VRAC puede formularse como ungüentos, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse
15 con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. Las formulaciones adecuadas para la administración por vía tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el agente activo en una base saborizante, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues
20 bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las soluciones o suspensiones se pueden aplicar directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un gotero, una pipeta o un aerosol. Las composiciones pueden proporcionarse en forma de dosis única o múltiples dosis.

25 La administración al tracto respiratorio también se puede lograr por medio de una formulación en aerosol en la que el ingrediente activo se proporciona en un paquete presurizado con un propulsor adecuado como un clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener convenientemente un tensioactivo tal como lecitina. La dosis del
30 fármaco puede controlarse mediante la provisión de una válvula dosificadora. Alternativamente, los ingredientes activos pueden proporcionarse en forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto en una base en polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). Convenientemente, el vehículo en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo se puede presentar en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo,
35 gelatina, o paquetes de ampollas desde los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

En las composiciones destinadas a la administración al tracto respiratorio, incluidas las composiciones intranasales, el compuesto generalmente tendrá un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo del orden de 5 micrómetros o menos. Tal tamaño de partícula se puede obtener por medios conocidos en la técnica, por ejemplo por micronización.

40 Cuando se desee, se pueden emplear composiciones adaptadas para proporcionar una liberación sostenida del ingrediente activo VRAC.

Las preparaciones farmacéuticas están preferentemente en formas de dosificación unitarias. En esta forma, la
45 preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades específicas de la preparación, tal como, comprimidos, cápsulas y polvos envasados en cartuchos o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, oblea o pastilla para chupar, o puede ser la cantidad adecuada de cualquiera de estos en forma envasada.

50 Los comprimidos o cápsulas para la administración por vía oral y los líquidos para la administración por vía intravenosa e infusión continua son composiciones preferidas.

En otras realizaciones de la presente descripción, el inhibidor de VRAC está formulado para la administración por vía
55 tópica.

Se pueden encontrar más detalles sobre las técnicas de formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton, PA).

60 Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de ingrediente activo, que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y toxicidad, por ejemplo DE₅₀ y DL₅₀, puede determinarse mediante procedimientos farmacológicos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. La relación de dosis entre los efectos

terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse por la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran índices terapéuticos grandes.

5 La dosis administrada debe, por supuesto, ajustarse cuidadosamente a la edad, el peso y la condición del individuo que está siendo tratado, así como a la vía de administración, la forma y el régimen de dosificación, y el resultado deseado, y la dosificación exacta, por supuesto, debe determinarse por el practicante.

10 La dosis real del VRAC modular y/o el agente anticancerígeno depende de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, y está a la discreción del médico, y puede variar según la titulación de la dosis según las circunstancias particulares para producir el efecto terapéutico deseado.

15 Por ejemplo, el bloqueador VRAC se puede administrar en una o varias dosis por día. Los intervalos ejemplares son de 10-200 mg/día por vía oral (por vía oral) administrados en una o dos dosis, como por ejemplo de 25-50 mg por vía oral dos veces al día.

El sujeto a tratar según la presente descripción puede ser cualquier sujeto humano o animal, preferentemente un ser humano que padezca cáncer.

Cáncer

20 La presente descripción se refiere a sensibilizar las células cancerosas a un tratamiento anticancerígeno o potenciar el efecto terapéutico de un tratamiento anticancerígeno.

25 En una realización de la presente descripción, el cáncer es resistente al tratamiento con un agente quimioterapéutico. Si un cáncer es resistente, el tratamiento conjunto con un bloqueador VRAC es capaz de volver a sensibilizar el cáncer al agente quimioterapéutico en cuestión. La resistencia de los cánceres puede ser resistencia *de novo* o resistencia adquirida. En general, un cáncer se considera resistente a una terapia anticancerígena particular si un paciente tratado con la dosis clínicamente aceptada del agente anticancerígeno no responde como se esperaba al agente anticancerígeno, es decir, en caso de empeoramiento, crecimiento o diseminación del cáncer (enfermedad progresiva).
30 El experto puede determinar si un cáncer es sensible o resistente a los fármacos.

En una realización de la presente descripción, el cáncer a tratar según la presente descripción puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas), glioblastomas, cánceres de cabeza y cuello, melanomas malignos, cáncer de piel de células basales, cáncer de piel de células escamosas, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, sarcomas, leucemia (mieloide y linfática), linfomas, mielomatosis.

40 En una realización de la presente descripción, el cáncer es metastásico.

En una realización de la presente descripción, el cáncer es cáncer colorrectal.

En una realización de la presente descripción, el cáncer es cáncer colorrectal metastásico.

45 En una realización de la presente descripción, el cáncer es cáncer de mama.

En una realización de la presente descripción, el cáncer es cáncer de mama metastásico.

En una realización de la presente descripción, el cáncer es glioblastoma.

50 En una realización de la presente descripción, el cáncer es un tumor sólido tal como un tumor sólido seleccionado de entre sarcoma, carcinoma y linfoma.

55 En una realización de la presente descripción, el cáncer no es un tumor sólido. Por ejemplo, el cáncer puede ser un tumor maligno hematológico que incluye, pero no se limita a, la leucemia.

En una realización de la presente descripción, el cáncer es cáncer de próstata, tal como cáncer de próstata metastásico.

60 En una realización de la presente descripción, el cáncer es un cáncer positivo para el receptor de hormona esteroide, por ejemplo, un cáncer positivo para el receptor de estrógeno, un cáncer positivo para el receptor de progesterona o un cáncer positivo para el receptor de andrógenos.

Tratamientos contra el cáncer

Un tratamiento anticancerígeno según la presente descripción puede ser el tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia. En una realización preferida de la presente descripción, el tratamiento anticancerígeno abarca el tratamiento con un agente quimioterapéutico.

Los fármacos de quimioterapia se pueden dividir en grupos según factores como su funcionamiento, su estructura química y su relación con otros fármacos. Algunos fármacos actúan de más de una manera y pueden pertenecer a más de un grupo. En una realización, el tratamiento anticancerígeno de la presente descripción abarca el tratamiento con más de un agente quimioterapéutico.

En una realización de la presente descripción, el tratamiento anticancerígeno es un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente citostático, un agente antihormonal, un agente antiangiogénico y un agente biológico anticancerígeno con una diana bien definida.

En una realización de la presente descripción, el agente quimioterapéutico es un agente citotóxico o un agente citostático.

En una realización preferida de la presente descripción, el tratamiento anticancerígeno es un agente quimioterapéutico y el modulador VRAC se administra conjuntamente con el agente quimioterapéutico.

El modulador VRAC se puede administrar antes de, simultáneamente con y/o después del inicio del tratamiento anticancerígeno. En una realización de la presente descripción, el modulador VRAC se administra antes del inicio del tratamiento anticancerígeno. En una realización de la presente descripción, el modulador VRAC se administra simultáneamente con el tratamiento anticancerígeno.

La administración conjunta como se usa en esta invención se refiere a la administración de un modulador VRAC y un tratamiento anticancerígeno a un sujeto, donde el modulador VRAC puede administrarse antes de, simultáneamente y/o después del tratamiento anticancerígeno.

La administración de un modulador VRAC potencia el efecto del tratamiento anticancerígeno. Por lo tanto, el efecto del tratamiento con un bloqueador VRAC y un tratamiento anticancerígeno es aditivo o sinérgico. En una realización de la presente descripción, el efecto del tratamiento es sinérgico.

En una realización de la presente descripción, la administración del modulador VRAC permite la administración del tratamiento anticancerígeno a una dosis inferior a la normal, es decir, una dosis que normalmente se consideraría una dosis subterapéutica.

En una realización de la presente descripción, la administración del modulador VRAC mejora el efecto clínico del tratamiento anticancerígeno. El efecto clínico puede ser determinado por el clínico.

En una realización de la presente descripción, el tratamiento anticancerígeno es un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en inhibidores de topoisomerasa, agentes antihormonas, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, corticosteroides, terapias anticancerígenas dirigidas, agentes diferenciadores e inmunoterapia.

Inhibidores de la topoisomerasa

El agente quimioterapéutico de la presente invención es un inhibidor de la topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38 o topotecan. Los inhibidores de la topoisomerasa interfieren con las enzimas llamadas topoisomerasas, que ayudan a separar las cadenas de ADN para que puedan copiarse durante la fase S. Los inhibidores de la topoisomerasa se usan para tratar el cáncer colorrectal, ciertas leucemias, así como los cánceres de pulmón, ovario, gastrointestinal y otros.

Los inhibidores de la topoisomerasa se agrupan según el tipo de enzima que afectan.

Los inhibidores de la topoisomerasa I incluyen:

- Topotecan
- Irinotecan (CPT-11). El metabolito activo de irinotecan es SN-38.

Los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen:

- Etopósido (VP-16)

- Tenipósido
- Mitoxantrona (también actúa como antibiótico antitumoral)
- Antraciclina

5 En una realización, el inhibidor de topoisomerasa I es Irinotecan o su metabolito activo SN-38.

En una realización, el inhibidor de la topoisomerasa I se combina con un modulador VRAC para el tratamiento del cáncer colorrectal, en particular el cáncer colorrectal que es resistente al tratamiento con dicho inhibidor de la topoisomerasa. En una realización, el cáncer colorrectal es cáncer colorrectal metastásico.

10

En una realización particular, irinotecan/SN-38 se administra conjuntamente con NS3728, para el tratamiento del cáncer colorrectal, en particular un cáncer colorrectal resistente a irinotecan/SN-38. En una realización, el cáncer colorrectal es cáncer colorrectal metastásico.

15 **Uso médico**

En una realización, la presente descripción se refiere a un procedimiento para sensibilizar células cancerosas a un tratamiento anticancerígeno que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un modulador VRAC.

20

En una realización, la presente descripción se refiere a un procedimiento para potenciar el efecto terapéutico de un tratamiento anticancerígeno que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un modulador VRAC.

25 En una realización, la presente descripción se refiere a un procedimiento para el tratamiento del cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un modulador VRAC y una cantidad efectiva de un tratamiento anticancerígeno, tal como un agente quimioterapéutico.

30 En una realización, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC y una cantidad efectiva de un agente quimioterapéutico para su uso como medicamento.

En una realización, la presente descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC y una cantidad efectiva de un agente quimioterapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer.

35 En una realización, la presente descripción se refiere a un modulador VRAC para su uso en la sensibilización de células cancerosas a un tratamiento anticancerígeno.

En una realización, la presente descripción se refiere a un modulador VRAC para su uso en la potenciación del efecto terapéutico de un tratamiento anticancerígeno.

40

En una realización, la presente descripción se refiere al uso de un modulador VRAC para la fabricación de un medicamento para sensibilizar las células cancerosas a un tratamiento anticancerígeno o para su uso para potenciar el efecto terapéutico de un tratamiento anticancerígeno.

45 En una realización, la presente descripción se refiere a un kit de partes que comprende un modulador VRAC y un agente quimioterapéutico, donde el modulador VRAC y el agente quimioterapéutico están formulados para la administración simultánea, secuencial o separada y opcionalmente instrucciones de uso.

50 En una realización particularmente interesante, la presente descripción se refiere a un modulador de VRAC y una terapia anticancerígena, tal como un agente quimioterapéutico, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, donde se ha determinado que dicho cáncer es resistente al tratamiento con dicha terapia anticancerígena. El tratamiento con un modulador VRAC vuelve a sensibilizar las células cancerosas resistentes al tratamiento con la terapia anticancerígena. La resistencia puede ser resistencia *de novo* o resistencia adquirida.

55 El tratamiento conjunto con el modulador VRAC como se describe en esta invención puede considerarse una terapia adyuvante para un tratamiento anticancerígeno ya que el modulador VRAC maximiza la efectividad de la terapia anticancerígena.

60 En una realización, el tratamiento con un modulador VRAC como se describe en esta invención puede considerarse una terapia neoadyuvante cuando se administra antes del tratamiento anticancerígeno.

Ejemplos

Ejemplo 1. Temozolomida y NS3728 en glioblastoma

- El efecto antitumoral *in vivo* de NS3728 en células de glioma C6 administradas como monoterapia (40 mg/kg/día) o en combinación con temozolomida (Temodal, 25 o 5 mg/kg / día) se probó en dos experimentos separados, utilizando el procedimiento del xenoinjerto o el modelo de saco de aire subcutáneo (SAS; véase Lichtenberg, J., P.J. Hjarnaa, P.E. Kristjansen, D. Hansen y L. Carpeta: El modo de saco de aire subcutáneo de rata: Un ensayo cuantitativo de angiogénesis en vasos inducidos *Pharmacology & Toxicology*, 1999, 84, 34-40.).
- 10 En el primer estudio, se inocularon 5 millones de células de glioma de rata C6 en el costado de ratas Fisher. Tres días después, los tumores habían crecido hasta un tamaño de 2-5 mm de diámetro y se inició el tratamiento. Se observó que las células C6 tenían un comportamiento de crecimiento agresivo y rápidamente se formaron tumores sólidos marcados. La administración por vía oral de NS3728 (40 mg/kg/día) en combinación con temozolomida (25 mg/kg/día) resultó en una reducción significativa de la tasa de crecimiento, mientras que ni NS3728 (40 mg/kg/día) ni temozolomida (25 mg/kg/día) mostraron algún efecto antitumoral significativo cuando se administró en monoterapia (véase la figura 1). Se observaron signos claros de toxicidad en todos los animales tratados con temozolomida y comprendieron un comportamiento moderado, apariencia encorvada y pérdida de peso corporal. El estudio finalizó el día 4 de tratamiento debido a razones éticas.
- 15
- 20 En el segundo estudio, el crecimiento del tumor se retrasó al inocular solo la mitad del número de células (2,5 millones de células C6 por animal) y utilizando la técnica del saco de aire subcutáneo (SAS). En resumen, las ratas fueron anestesiadas con CO₂ / O₂ y se introdujeron dorsalmente 10-15 ml de aire mediante inyecciones subcutáneas para producir un saco de aire ubicado aproximadamente a 4-5 cm detrás de la cabeza. La pared del saco de aire se volvió progresivamente más gruesa con el tiempo y después de 10-14 días se estableció un revestimiento suficiente de células con la apariencia de una membrana transparente. Las células de glioma C6 se inocularon en las ratas directamente en la membrana. El tratamiento se inició el día de la inoculación y el estudio finalizó el día 10 del tratamiento. Las células C6 mostraron un crecimiento menos agresivo y la administración por vía oral de NS3728 (40 mg/kg/día) administrada como monoterapia o en combinación con temozolomida (5 mg/kg/día) produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral (figura 2) mientras que el tratamiento con temozolomida sola no resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral medida por el peso del tumor.
- 25
- 30

Los experimentos presentados aquí demuestran que NS3728 dosificado por vía oral en combinación con temozolomida (terapia de "primera línea" contra el glioblastoma en Dinamarca) retrasa el crecimiento de las células de glioma C6 en un 50-55 % independientemente del sitio de inoculación. En comparación con la monoterapia con cualquiera de los compuestos, los efectos fueron claramente aditivos o sinérgicos. Por lo tanto, los resultados muestran que el tratamiento con NS3728 sensibiliza las células cancerosas al tratamiento y potencia el efecto de la temozolomida *in vivo*.

35

Ejemplo 2. Paclitaxel o 5-fluorouracilo y NS3728 en cáncer de colon

- 40 El efecto antitumoral *in vivo* de NS3728 en la línea celular de cáncer de colon HT29 humano se probó como monoterapia (80 mg/kg) respectivamente en combinación con paclitaxel (5 mg/kg) o 5-fluorouracilo (30 mg/kg) en dos series experimentales independientes. NS3728 se administró por vía oral (PO), mientras que tanto paclitaxel como 5-fluorouracilo se dosificaron por vía intraperitoneal (IP) mediante inyección. Las células cancerosas se inocularon por vía subcutánea en t = 0 (un animal en el grupo de vehículos no desarrolló un tumor y se excluyó del experimento de 5-fluorouracilo), y los tratamientos comenzaron en el día 4 y terminaron en el día 22. Los experimentos comprendieron los siguientes grupos de dosificación (n = 9-10/grupo):
- 45
- 1) vehículo,
 - 2) NS3728
 - 50 3) paclitaxel o 5-fluorouracilo,
 - 4) NS3728 + paclitaxel o NS3728 + 5-fluorouracilo.

La dosificación se produjo en períodos (días 4-8; días 11-15, días 18-22) con la dosificación diaria de NS3728 y el fármaco citotóxico, interrumpido por las vacaciones de dosificación. Los resultados se muestran en la figura 3 (5-fluorouracilo) y la figura 4 (paclitaxel). En ambos experimentos, el volumen tumoral en el grupo de vehículos aumentó de forma superlineal hasta un volumen tumoral final de 166 mm³ en el experimento de 5-fluorouracilo y 122 mm³ en el experimento de paclitaxel. Se observó una depresión leve (no significativa) de las curvas de crecimiento tanto con NS3728 como con fármacos citotóxicos administrados como monoterapia. En contraste, las curvas de crecimiento se redujeron aún más con la terapia de combinación (NS3728 y el fármaco citotóxico) con ambos fármacos citotóxicos, respectivamente, alcanzando significación (prueba t) para el grupo de control para ambas combinaciones (P = 0,03 para NS3728 + 5-fluorouracilo y P = 0,003 para NS3728 + paclitaxel).

55

60

En conclusión, se ha demostrado que un tumor HT29 xenoinjertado humano muestra una mayor sensibilidad al tratamiento combinado de NS3728 y 5-fluorouracilo o paclitaxel en comparación con la monoterapia con uno de los fármacos quimioterapéuticos. Por lo tanto, NS3728 es capaz de potenciar el efecto de 5-fluorouracilo y paclitaxel *in vivo*.

5

Ejemplo 3. Docetaxel y NS3728 en líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB231 resistentes a docetaxel.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y al menos 6 subtipos de cáncer de mama han sido descritos previamente por Soerlie y col (PMID: 11553815). Como una diferencia importante, el cáncer de mama se puede dividir en cáncer de mama positivo para receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y negativo para receptores de hormonas. Se ha incluido en los experimentos estos dos subtipos principales. Se establecen líneas celulares de cáncer de mama humano que son resistentes a la quimioterapia docetaxel como se describe en Hansen y col 2015 (PMID: 25596703). Estas líneas celulares son MCF-7 y MDA-MB-231.

15

MCF-7: receptor de estrógeno y progesterona positivo MDA-MB-231: receptor de estrógenos y progesterona negativo y receptor HER2 negativo (el denominado fenotipo triple negativo)

Se han examinado los efectos de NS3728 como fármaco único o en combinación con docetaxel en líneas celulares de cáncer de mama resistente a docetaxel.

20

Se emplearon ensayos de viabilidad celular estándar de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se dejaron adherir durante 24 horas. Posteriormente, NS3728, docetaxel o combinaciones de los dos fármacos se añadieron durante 72 horas antes de determinar la viabilidad celular. Todos los valores se expresan en porcentaje de células no tratadas (llamadas: "in tratamiento"). "DMSO" se refiere al control del disolvente ya que tanto NS3728 como docetaxel se diluyen en DMSO. Por lo tanto, el control DMSO (dimetil sulfóxido) se incluye para investigar cualquier efecto potencial sobre la viabilidad celular por parte del disolvente orgánico. Cada punto de datos se realizó por triplicado.

25

DMSO no afectó la viabilidad celular de las células de cáncer de mama MCF-7 resistentes a docetaxel. Se eligió 65 nM de docetaxel ya que esta es la concentración a la que las células de cáncer de mama MCF-7 resistentes a docetaxel se hicieron resistentes. Docetaxel 65 nM y NS3728 40 µM proporcionados como monoterapia no disminuyeron la viabilidad celular. La combinación de NS3728 40 µM y docetaxel 65 nM dio como resultado un efecto combinatorio sobre la viabilidad celular para las células de cáncer de mama MCF-7 resistentes a docetaxel.

30

El efecto de NS3728, docetaxel y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células de cáncer de mama MCF-7 resistentes a docetaxel se muestra en la figura 5

DMSO no afectó la viabilidad celular de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 resistentes a docetaxel. Se eligió 150 nM de docetaxel ya que esta es la concentración a la que las células se hicieron resistentes. Docetaxel 150 nM redujo la viabilidad a aproximadamente el 50 % de los controles no tratados. NS3728 50 µM no disminuyó la viabilidad celular. A NS3728 50 µM y docetaxel 150 nM se observó un efecto combinatorio sobre la viabilidad celular para las células de cáncer de mama MDA-MB-231 resistentes a docetaxel.

40

El efecto de NS3728, docetaxel y la combinación de los mismos sobre la viabilidad celular de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 resistentes a docetaxel se muestra en la figura 6.

45

Conclusión

Estos estudios preclínicos demuestran que el inhibidor de VRAC NS3728 puede potenciar el efecto de docetaxel sobre las líneas celulares de cáncer de mama resistentes a docetaxel. Por lo tanto, los datos muestran que NS3728 es capaz de volver a sensibilizar las células cancerosas resistentes a docetaxel para el tratamiento con docetaxel.

50

Ejemplo 4. Oxaliplatino o SN38 y NS3728 en líneas celulares parentales HCT116, HT29 y LoVo de cáncer colorrectal humano (CRC).

55

Las células CRC muestran inestabilidad genética causada por la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad de microsatélites (MSI) y el fenotipo del metilador de la isla CpG (CIMP), que dan como resultado la activación de protooncogenes como KRAS y la inactivación de genes supresores de tumores como TP53 (p53). La presencia o ausencia de ciertas alteraciones genéticas puede determinar la respuesta de los pacientes con CRC al tratamiento y, por lo tanto, es importante estudiar las líneas celulares de CRC que albergan diferentes combinaciones de las alteraciones genéticas descritas anteriormente. Por lo tanto, se han elegido tres líneas celulares para representar las

60

principales alteraciones genéticas observadas en pacientes con CRC:

- HCT116: MSI, KRAS mutado, TP53 tipo natural, CIMP +, CIN -, de tumor primario (Dukes C)
- HT29: MSS, KRAS tipo natural, TP53 mutado, CIMP +, CIN +, de tumor primario (Dukes C)
- 5 - LoVo: MSI, KRAS mutado, TP53 tipo natural, CIMP -, CIN -, de metástasis (Dukes C)

Se han examinado los efectos de NS3728 como fármaco único o en combinación con OXP o SN-38 en las líneas celulares parentales, es decir, sensibles al fármaco. Se han empleado ensayos estándar de viabilidad celular de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (10.000 10 células/pocillo) y se dejaron adherir durante 24 horas. Posteriormente, NS3728, OXP, SN-38 o combinaciones de NS3728 con uno de los fármacos citotóxicos se añadieron durante 48 horas antes de determinar la viabilidad celular. Todos los valores se expresan en porcentaje de células no tratadas (llamadas: s"in tratamiento"). "DMSO" se refiere al control del disolvente ya que tanto NS3728 como los fármacos quimioterapéuticos se diluyen en DMSO. Por lo tanto, el control DMSO (dimetil sulfóxido) se incluye para investigar cualquier efecto potencial sobre la viabilidad celular por 15 parte del disolvente orgánico. Cada punto de datos se realizó por triplicado.

En las células parentales, se ha probado el efecto de NS3728 como agente único y en combinación con OXP o SN-38.

20 **Líneas celulares CRC parentales: NS3728 y OXP**

DMSO causó una reducción menor en la viabilidad celular de las células parentales HCT116. NS3728 redujo la viabilidad celular a aproximadamente el 50 % de las células no tratadas y OXP dependiente de la dosis redujo la viabilidad celular de las células parentales HCT116. Las combinaciones de NS3728 40 o 50 µM y oxaliplatino 25 0,16/0,8/4/20 µM no inhibieron la viabilidad celular más que la monoterapia en células parentales HCT116.

El efecto de la combinación de NS3728 y OXA sobre la viabilidad celular de las células cancerosas parentales HCT116 CRC se muestra en la figura 7.

30 En las células parentales HT29 y LoVo tampoco se observó ningún efecto inhibitorio combinatorio sobre la viabilidad celular de NS3728 y OXP (datos no mostrados).

Por lo tanto, no parece haber ningún efecto de combinar NS3728 y oxaliplatino en el cáncer colorrectal sensible a OXP.

35 **Líneas celulares CRC parentales HCT116: NS3728 y SN-38**

DMSO causó una reducción menor en la viabilidad celular. NS3728 redujo la viabilidad celular a aproximadamente el 50 % de las células no tratadas a dos concentraciones (40 y 50 µM). SN-38 (0,16 µM) también disminuyó la viabilidad 40 a aproximadamente el 50 % de las células no tratadas. Las combinaciones de NS3728 40 o 50 µM y SN-38 0,16 µM tuvieron un efecto inhibitorio combinatorio sobre la viabilidad celular reduciendo el NS3728 40 µM + SN-38 la viabilidad celular a aproximadamente el 30 % de las células no tratadas y reduciendo el NS3728 50 µM + SN-38 la viabilidad celular a aproximadamente el 23 % de las células no tratadas.

45 El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas parentales HCT116 CRC se muestra en la figura 8.

Líneas celulares CRC parentales HT29: NS3728 y SN-38

50 DMSO redujo la viabilidad celular en esta línea celular a aproximadamente el 78 % de las células no tratadas. NS3728 redujo la viabilidad celular a aproximadamente el 90 % de las células no tratadas a 40 µM y a aproximadamente el 77 % de células no tratadas a 50 µM. SN-38 (0,032 µM) disminuyó la viabilidad a aproximadamente el 77 % de las células no tratadas. Las combinaciones de NS3728 40 o 50 µM y SN-38 0,032 µM causaron un efecto inhibitorio combinatorio sobre la viabilidad celular reduciendo el NS3728 40 µM + SN-38 la viabilidad celular a aproximadamente 55 el 50 % de las células no tratadas y reduciendo el NS3728 50 µM + SN-38 la viabilidad celular a aproximadamente el 38 % de las células no tratadas.

El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas parentales HT29 CRC se muestra en la figura 9.

60 **Líneas celulares CRV parentales LoVo: NS3728 y SN-38**

DMSO redujo la viabilidad celular en esta línea celular a aproximadamente el 75 % de las células no tratadas. NS3728 redujo la viabilidad celular a aproximadamente el 45 % de las células no tratadas a 40 μM y a aproximadamente el 38 % de las células no tratadas a 50 μM . SN-38 (0,0064 μM) disminuyó la viabilidad a aproximadamente el 53 % de las células no tratadas. Las combinaciones de NS3728 40 o 50 μM y SN-38 0,0064 μM causaron un efecto inhibitorio 5 combinatorio sobre la viabilidad celular reduciendo el NS3728 40 μM + SN-38 la viabilidad celular a aproximadamente el 35 % de las células no tratadas y reduciendo el NS3728 50 μM + SN-38 la viabilidad celular a aproximadamente el 22 % de las células no tratadas.

El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas LoVo CRC 10 parentales se muestra en la figura 10.

Conclusión

Estos estudios preclínicos demuestran que el inhibidor de VRAC NS3728 puede 1) inhibir el crecimiento de células 15 CRC cuando se administra como monoterapia y 2) mejorar el efecto de ciertos tipos de quimioterapia en células humanas CRC. No se encontró efecto combinatorio de NS3728 y oxaliplatino. Por lo tanto, los resultados muestran que el tratamiento con un inhibidor de VRAC puede potenciar el efecto de ciertos tipos de quimioterapia.

Ejemplo 5. Oxaliplatino o SN-38 y NS3728 en líneas celulares de HCT116, HT29 y LoVo de cáncer colorrectal humano (CRC) resistentes a oxaliplatino (OMP) o SN-38.

Se han establecido líneas celulares de cáncer de CRC humano que son resistentes a los quimioterapéuticos oxaliplatino (OMP) o SN-38 (el metabolito activo de irinotecan) como se describe en Jensen y col 2015 (PMID: 25759163). Estas líneas celulares son HCT116, HT29 y LoVo.

25 Se han examinado los efectos de NS3728 como fármaco único o en combinación con OMP o SN-38 en las líneas celulares resistentes a OMP y SN-38. Se han empleado ensayos estándar de viabilidad celular de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se dejaron adherir durante 24 horas. Posteriormente, NS3728, OMP, SN-38 o combinaciones de los fármacos se 30 agregaron durante 48 horas antes de determinar la viabilidad celular. Todos los valores se expresan en porcentaje de células no tratadas (llamadas: s"in tratamiento"). "DMSO" se refiere al control del disolvente ya que tanto NS3728 como los fármacos quimioterapéuticos se diluyen en DMSO. Por lo tanto, el control DMSO (dimetil sulfóxido) se incluye para investigar cualquier efecto potencial sobre la viabilidad celular por parte del disolvente orgánico. Cada punto de datos se realizó por triplicado.

35 En células resistentes a OMP, se ha probado el efecto de NS3728 como agente único y en combinación con SN-38 u OMP.

40 En células resistentes a SN-38, se ha probado el efecto de NS3728 como agente único y en combinación con SN-38 u OMP.

Líneas celulares CRC resistentes a SN-38: NS3728 y oxaliplatino

45 No se encontró ningún efecto de la combinación de NS3728 y oxaliplatino en las líneas celulares de cáncer HCT116, HT29 y LoVo CRC resistentes a SN-38 en comparación con la monoterapia con NS3728 u oxaliplatino (datos no mostrados). Por lo tanto, NS3728 no parece ser capaz de potenciar el efecto terapéutico del oxaliplatino en células CRC sensibles al oxaliplatino que son resistentes al SN-38.

Líneas celulares HCT116 CRC resistentes a SN-38: NS3728 y SN-38

50 En esta línea celular, DMSO no tuvo efecto sobre la viabilidad celular. NS3728 (30 μM) redujo la viabilidad celular a aproximadamente el 85 % de las células no tratadas y SN-38 (4 μM) casi no tuvo efecto sobre la viabilidad celular. Sin embargo, las combinaciones de SN-38 4 μM y NS3728 30 μM causaron una reducción combinada en la viabilidad celular y, por lo tanto, redujeron significativamente la viabilidad celular a aproximadamente el 60 %.

55 El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas HCT116 CRC resistentes a SN-38 se muestra en la figura 11.

Líneas celulares HCT29 CRC resistentes a SN-38: NS3728 y SN-38

60 DMSO no tuvo efecto sobre la viabilidad celular. NS3728 (30 μM) aumentó la viabilidad a aproximadamente el 120 % de las células no tratadas. NS3728 (40 μM) no tuvo efecto sobre la viabilidad celular y NS3728 (50 μM) redujo la

viabilidad a aproximadamente el 85 % de las células no tratadas. SN-38 (0,8 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 78 % de las células no tratadas. Las combinaciones de SN-38 0,8 μM y NS3728 30/40/50 μM causaron una reducción combinada significativa en la viabilidad celular a menos del 30 % de las células no tratadas para las tres concentraciones de NS3728.

5 El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas HT29 CRC resistentes a SN-38 se muestra en la figura 12.

Células cancerosas LoVo CRC resistentes a SN-38: - NS3728 y SN-38

10 DMSO redujo la viabilidad celular en esta línea celular a aproximadamente el 80 % de las células no tratadas. NS3728 (30 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 80 % de las células no tratadas, NS3728 (40 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 57 % y NS3728 (50 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 50 % de las células no tratadas. SN-38 (0,16 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 78 % de las células no tratadas. Las
15 combinaciones de SN-38 0,16 μM y NS3728 30/40/50 μM causaron una reducción combinada significativa en la viabilidad celular a menos del 20 % de las células no tratadas para las tres concentraciones de NS3728.

El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas LoVo CRC resistentes a SN-38 se muestra en la figura 13.

20 **Células cancerosas HT29 CCR resistentes a oxaliplatino: NS3728 y SN-38**

DMSO no causó esencialmente ningún cambio en la viabilidad celular. NS3728 (20 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 85 % de las células no tratadas y SN-38 (0,1 μM) redujo la viabilidad a aproximadamente el 43 %
25 de las células no tratadas. Las combinaciones de NS3728 20 μM y SN-38 0,1 μM causaron efectos combinados sobre la viabilidad celular.

El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas HT29 CRC resistentes a oxaliplatino se muestra en la figura 14.

30 **Células cancerosas LoVo CRC resistentes a oxaliplatino: NS3728 y SN-38**

DMSO redujo la viabilidad a aproximadamente el 85 % de las células no tratadas. Las combinaciones de NS3728 20/30/40/50 μM y SN-38 (0,005 μM) tuvieron efectos combinados significativos sobre la viabilidad celular.

35 El efecto de la combinación de NS3728 y SN-38 sobre la viabilidad celular de las células cancerosas LoVo CRC resistentes a oxaliplatino se muestra en la figura 15.

Células cancerosas HT116 CRC resistentes a oxaliplatino: NS3728 y SN-38

40 En las células HCT116 CRC resistentes a oxaliplatino, se observó un efecto combinado inhibitorio menor cuando NS3728 se combinó con SN-38 (datos no mostrados).

Células cancerosas CRC resistentes a oxaliplatino: NS3728 y oxaliplatino

45 No se encontró ningún efecto de la combinación de NS3728 y oxaliplatino en las líneas celulares de cáncer HCT116, HT29 y LoVo CRC resistentes a oxaliplatino en comparación con la monoterapia con NS3728 u oxaliplatino (datos no mostrados). Por lo tanto, NS3728 no parece ser capaz de volver a sensibilizar las células CRC resistentes a oxaliplatino para el tratamiento con oxaliplatino.

50 **Conclusión**

Estos estudios preclínicos demuestran que el inhibidor de VRAC NS3728 puede mejorar el efecto de ciertos tipos de quimioterapia en líneas celulares de CRC resistentes. De particular interés es que NS3728 también mejoró el efecto
55 de SN-38 en células cancerosas con resistencia adquirida a SN-38 o con resistencia a oxaliplatino adquirida. Los datos sugieren que NS3728 es capaz de volver a sensibilizar las células cancerosas resistentes a los fármacos SN-38 para el tratamiento con SN-38.

60 **Ejemplo 6. Tamoxifeno o fulvestrant en combinación con NS3728 en líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7/LCC2 resistentes a tamoxifeno o fulvestrant MCF-7/LCC9.**

Se establecieron líneas celulares de cáncer de mama humano que son resistentes al antiestrógeno tamoxifeno como

se describe en Brunner y col 1993 (PMID: 8324732). Estas líneas celulares son MCF-7/LCC2. También se establecieron líneas celulares de cáncer de mama humano que son resistentes al antiestrógeno fulvestrant como se describe en Brunner y col 1997 (PMID: 9270017). MCF-7 es una línea celular positiva al receptor de estrógeno y progesterona.

5

Se han examinado los efectos de NS3728 como fármaco único o en combinación con tamoxifeno o fulvestrant en líneas celulares de cáncer de mama resistente a fármacos MCF-7/LCC2 o MCF-7/LCC9, respectivamente.

Se emplearon ensayos de viabilidad celular estándar de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

10 Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se dejaron adherir durante 24 horas. Posteriormente, NS3728, docetaxel o combinaciones de los dos fármacos se añadieron durante 72 horas antes de determinar la viabilidad celular. Todos los valores se expresan en porcentaje de células no tratadas (llamadas: "in tratamiento"). Cada punto de datos se realizó por triplicado.

15 Se eligió 0,1 μM de tamoxifeno ya que esta es la concentración que se demostró en la publicación original que causa solo efectos menores en el crecimiento celular en las células MCF-7/LCC2, mientras que el crecimiento de las células sensibles al tamoxifeno se inhibió significativamente más. NS3728 40 μM causó una reducción menor en la viabilidad celular al 70 % del control no tratado. Tamoxifeno 0,1 μM no tuvo efecto sobre la viabilidad celular de las células MCF-7/LCC2 resistentes al tamoxifeno. La combinación de NS3728 40 μM y tamoxifeno 0,1 μM causó una reducción fuerte y significativa ($P < 0,05$) de la viabilidad de las células MCF-7/LCC2 a menos del 40 % de las células no tratadas (figura 16).

25 Se eligió 1 μM de fulvestrant ya que esta es la concentración que se aplicó en la publicación original como la concentración final para establecer la línea celular MCF-7/LCC9 y esta concentración inhibe fuertemente el crecimiento de células MCF-7 sensibles a fulvestrant (Brünner y col., 1997, PMID 9270017). NS3728 40 μM causó una reducción en la viabilidad celular al 60 % del control no tratado. Fulvestrant 1 μM no tuvo efecto sobre la viabilidad celular de las células MCF-7/LCC9 resistentes a fulvestrant. La combinación de NS3728 40 μM y fulvestrant 1 μM causó una reducción fuerte y significativa ($P < 0,05$) de la viabilidad de células MCF-7/LCC9 al 24 % de las células no tratadas (figura 17).

30

Conclusión

Estos estudios preclínicos demuestran que el inhibidor de VRAC NS3728 puede mejorar el efecto de dos tipos de antiestrógenos, a saber, tamoxifeno y fulvestrant, en las células de cáncer de mama MCF-7 que se hacen resistentes a estos tipos de antiestrógenos. Por lo tanto, los datos sugieren que NS3728 es capaz de volver a sensibilizar las células de cáncer de mama resistentes a los estrógenos para el tratamiento con antiestrógenos, en particular al tamoxifeno y fulvestrant.

Ejemplo 7. Investigación in vivo del efecto de re-sensibilización de NS3728 en tumores de xenoinjerto resistentes a docetaxel (cáncer de mama)

Los experimentos de xenoinjerto de ratón se realizan con un par de líneas celulares de cáncer de mama humano triple negativo sensibles y resistentes a docetaxel (MDA-MB-231). Los ratones utilizados para los experimentos están gravemente inmunocomprometidos para evitar el rechazo de las células cancerosas humanas.

45

La configuración experimental comprende tres etapas:

1. "crecimiento"
2. "dosis-respuesta"
3. "tratamiento con fármaco":

50

Etapas 1: Crecimiento de células MDA-MB-231 sensibles (parentales) y resistentes a docetaxel

Para determinar el número de células óptimo para el crecimiento tumoral de xenoinjerto de células MDA-MB-231 sensibles a docetaxel y resistentes a docetaxel, se inoculan dos grupos de ratones con diferentes números de células MDA-MB-231 sensibles o resistentes a docetaxel. Este experimento determina el número óptimo de células cancerosas, lo cual es importante para los experimentos posteriores de dosis-respuesta en las etapas 2 y 3.

Etapas 2: Fenotipo de resistencia, dosis-respuesta de docetaxel

60 Para confirmar los fenotipos sensibles y resistentes a docetaxel en las células MDA-MB-231 xenoinjertadas, los ratones se tratan con docetaxel cuando los tumores se han establecido. Se inoculan células MDA-MB-231 sensibles o resistentes a docetaxel en ratones, con números de células determinados a partir de la etapa 1. Este experimento

es importante para demostrar que las células cancerosas también son sensibles o resistentes, respectivamente, en un entorno in vivo.

Etapas 3: Tratamiento de re-sensibilización de docetaxel con NS3728

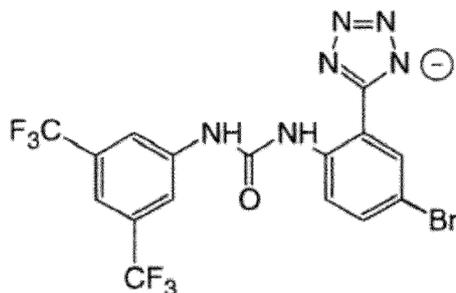
- 5 Para determinar el efecto de re-sensibilización de NS3728 en combinación con docetaxel en tumores de xenoinjerto resistentes a docetaxel, se inoculan células MDA-MB-231 parentales y resistentes a docetaxel en ratones y se tratan con vehículo (grupo de control), docetaxel solo, NS3728 solo o una combinación de NS3728 y docetaxel.
- 10 En todas las etapas, la formación de tumores se controla por palpación y se mide con un calibrador. El volumen tumoral se calcula y se representa frente al tiempo en una curva de crecimiento. Los ratones se sacrifican cuando los tumores están cerca del tamaño máximo (12 mm) o si los ratones muestran signos de incomodidad o enfermedad.

Conclusión

- 15 En base a los experimentos in vitro (figura 6) y los experimentos de xenoinjerto con paclitaxel (figura 4) se espera observar que una combinación de docetaxel y NS3728 restaurará la sensibilidad al docetaxel en las células MDA-MB-231 resistentes a docetaxel xenoinjertadas, reflejado en un volumen tumoral reducido en comparación con NS3728 solo o docetaxel solo.

REIVINDICACIONES

1. Un modulador VRAC de fórmula I



5

(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un tratamiento anticancerígeno para su uso en el tratamiento del cáncer, donde el tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38 o topotecan.

10

2. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el modulador VRAC se administra antes de y/o simultáneamente con y/o después del inicio del tratamiento anticancerígeno.

15

3. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el modulador VRAC está en forma de comprimidos o cápsulas para la administración por vía oral.

20

4. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el modulador VRAC está en forma de un líquido para la administración por vía intravenosa o infusión continua.

25

5. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer es resistente al tratamiento anticancerígeno.

25

6. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer es un tumor sólido, tal como un tumor sólido seleccionado de entre sarcoma, carcinoma y linfoma.

30

7. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas), glioblastomas, cánceres de cabeza y cuello, melanomas malignos, cáncer de piel de células basales, cáncer de piel de células escamosas, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer anal, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de ovario, cáncer de vesícula biliar, sarcomas, leucemia (mieloide y linfática), linfomas, mielomatosis.

35

8. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer es cáncer metastásico.

40

9. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer es cáncer colorrectal, tal como cáncer colorrectal metastásico.

10. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el cáncer es cáncer de mama, tal como cáncer de mama metastásico.

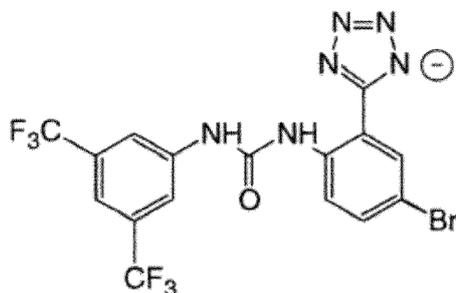
45

11. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el cáncer es glioblastoma.

50

12. El modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el cáncer es cáncer de pulmón.

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC de fórmula I



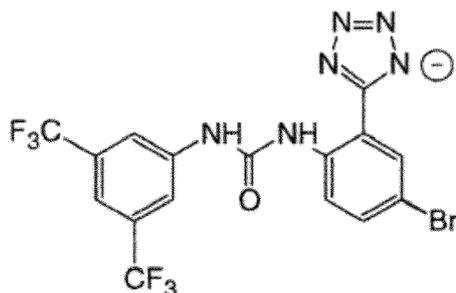
5

(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un tratamiento anticancerígeno y uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, donde el tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN- 38 o topotecan.

10

14. Una composición que comprende una cantidad efectiva de un modulador VRAC de fórmula I

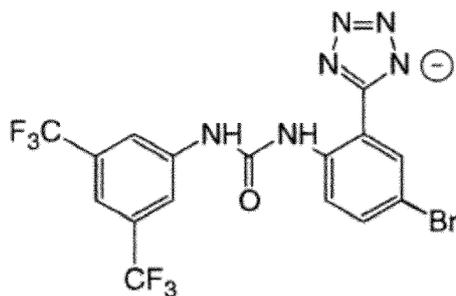


(I)

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad efectiva de un tratamiento anticancerígeno para su uso como medicamento, donde el tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38 o topotecan.

15.
20

- Un kit de piezas que comprende un modulador VRAC de fórmula I



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un tratamiento anticancerígeno, donde el modulador VRAC y el tratamiento anticancerígeno están formulados para la administración simultánea, secuencial o separada y opcionalmente instrucciones de uso, donde dicho tratamiento anticancerígeno es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado de entre irinotecan, su metabolito activo SN-38, o topotecan.

25

Fig. 1

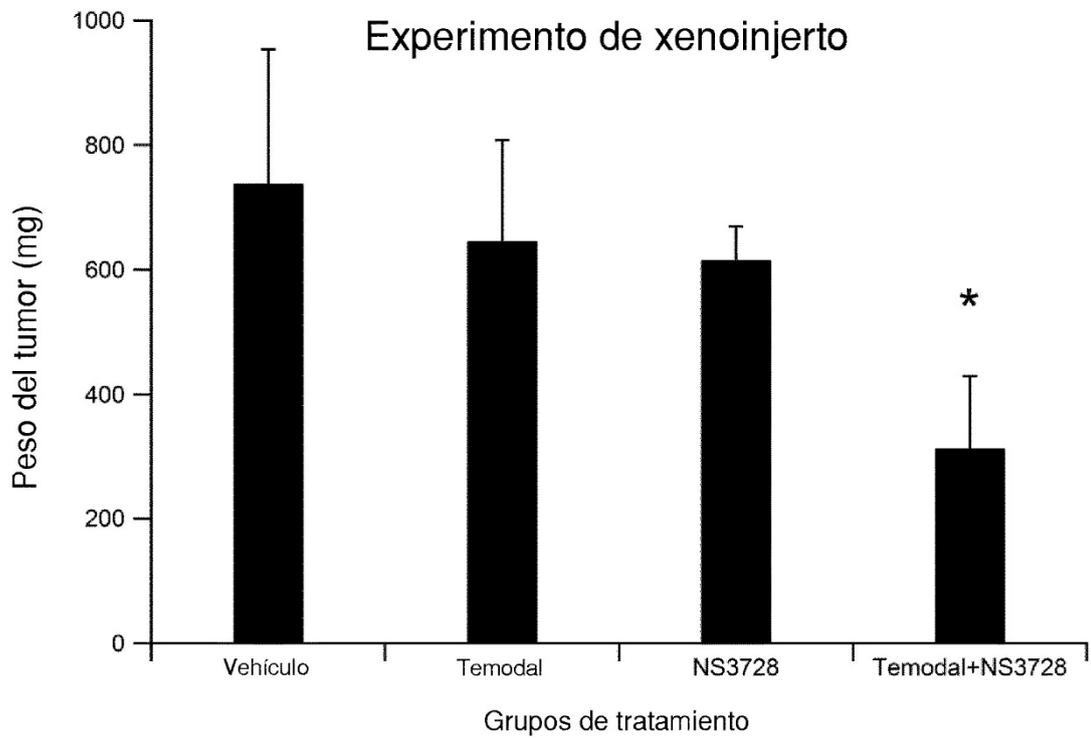


Fig. 2

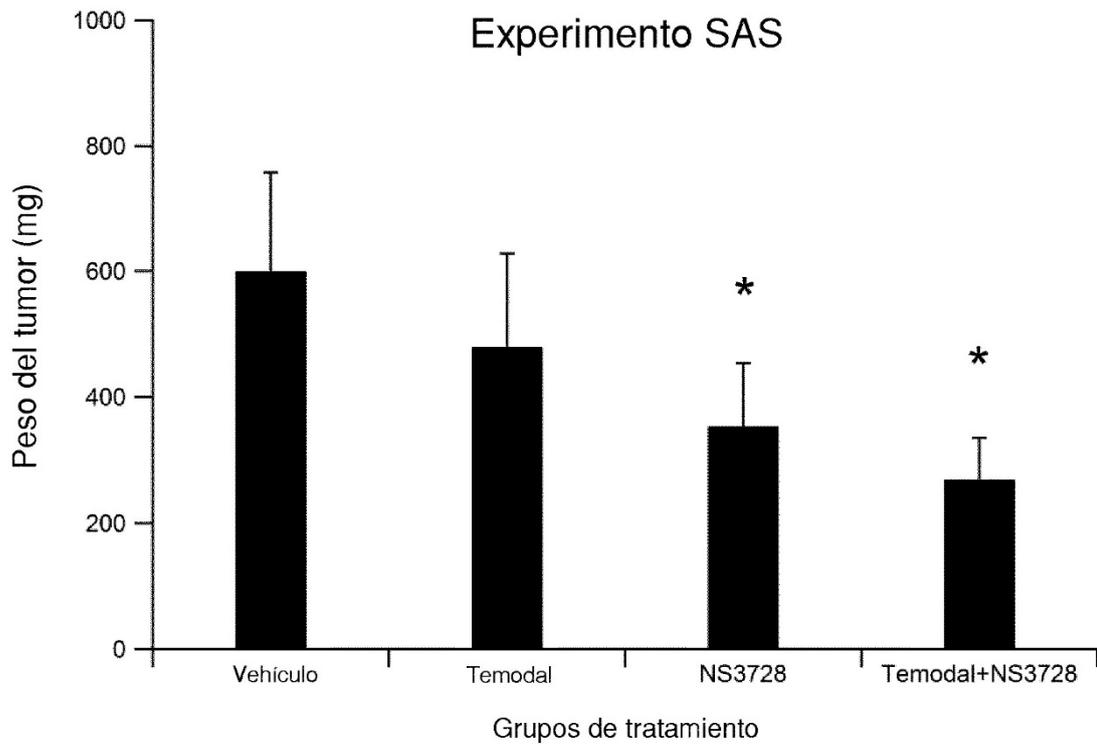


Fig. 3

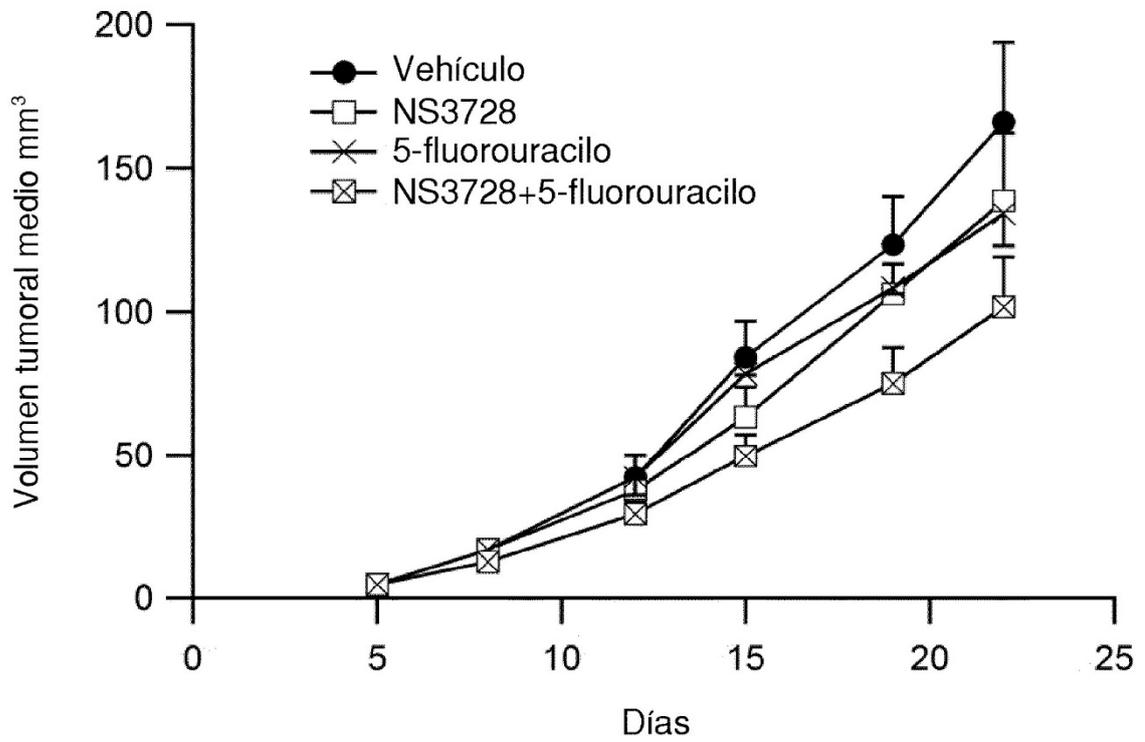


Fig.4

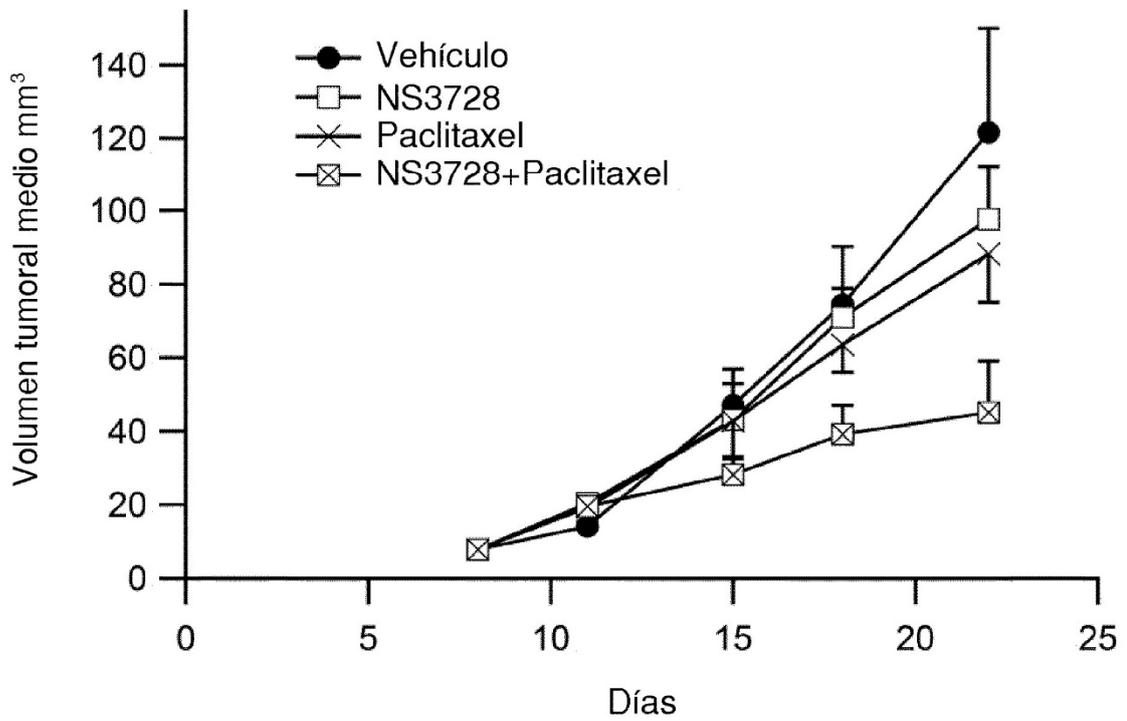


Fig. 5

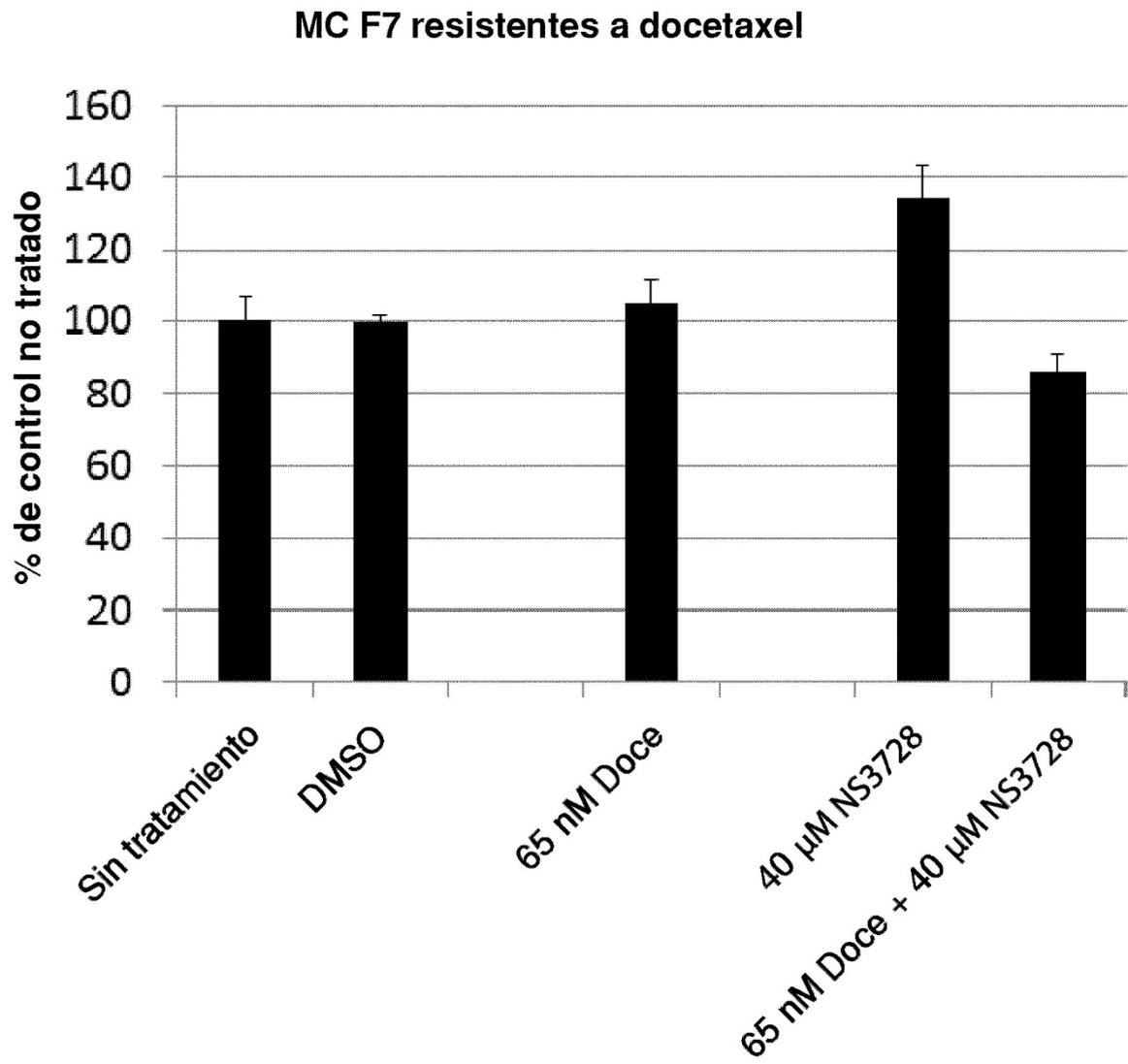


Fig. 6

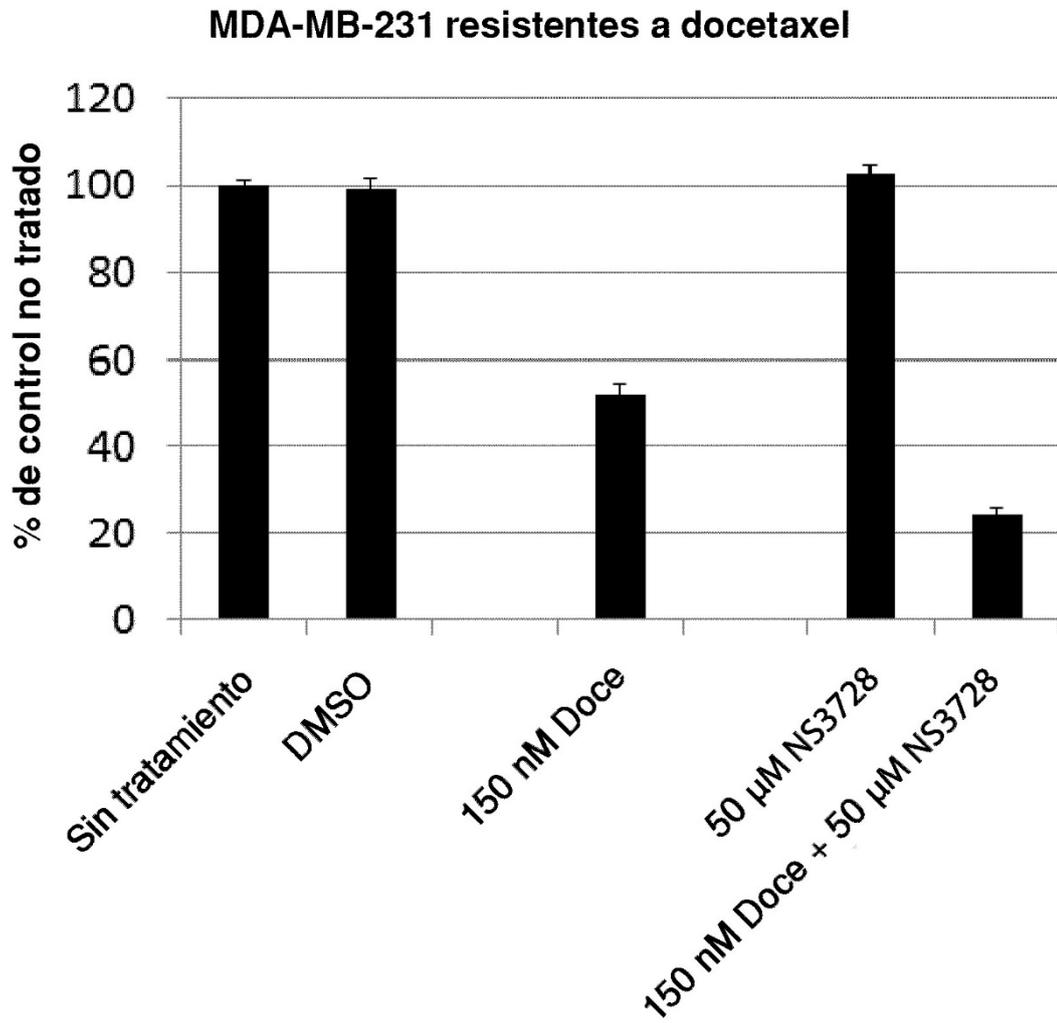


Fig. 7

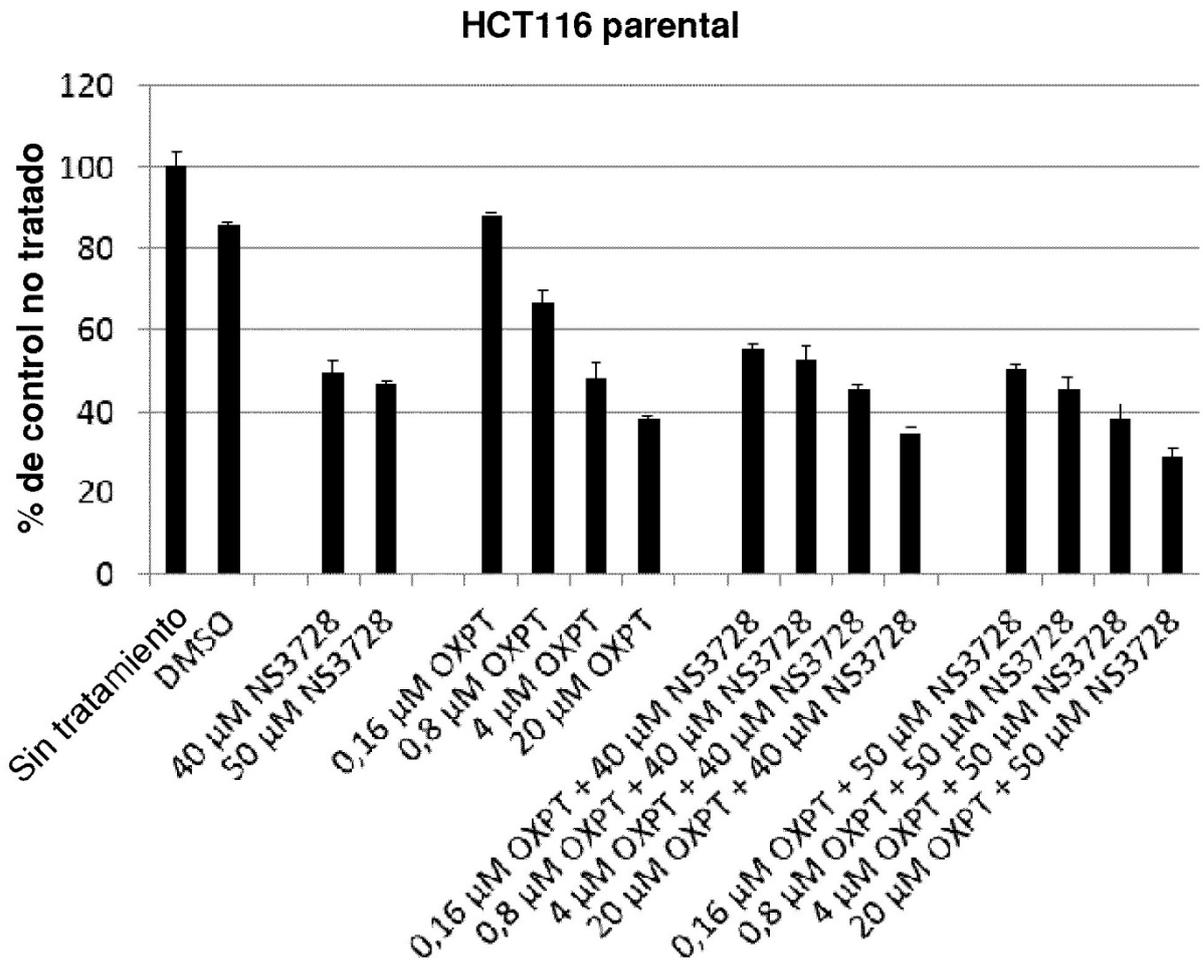


Fig. 8

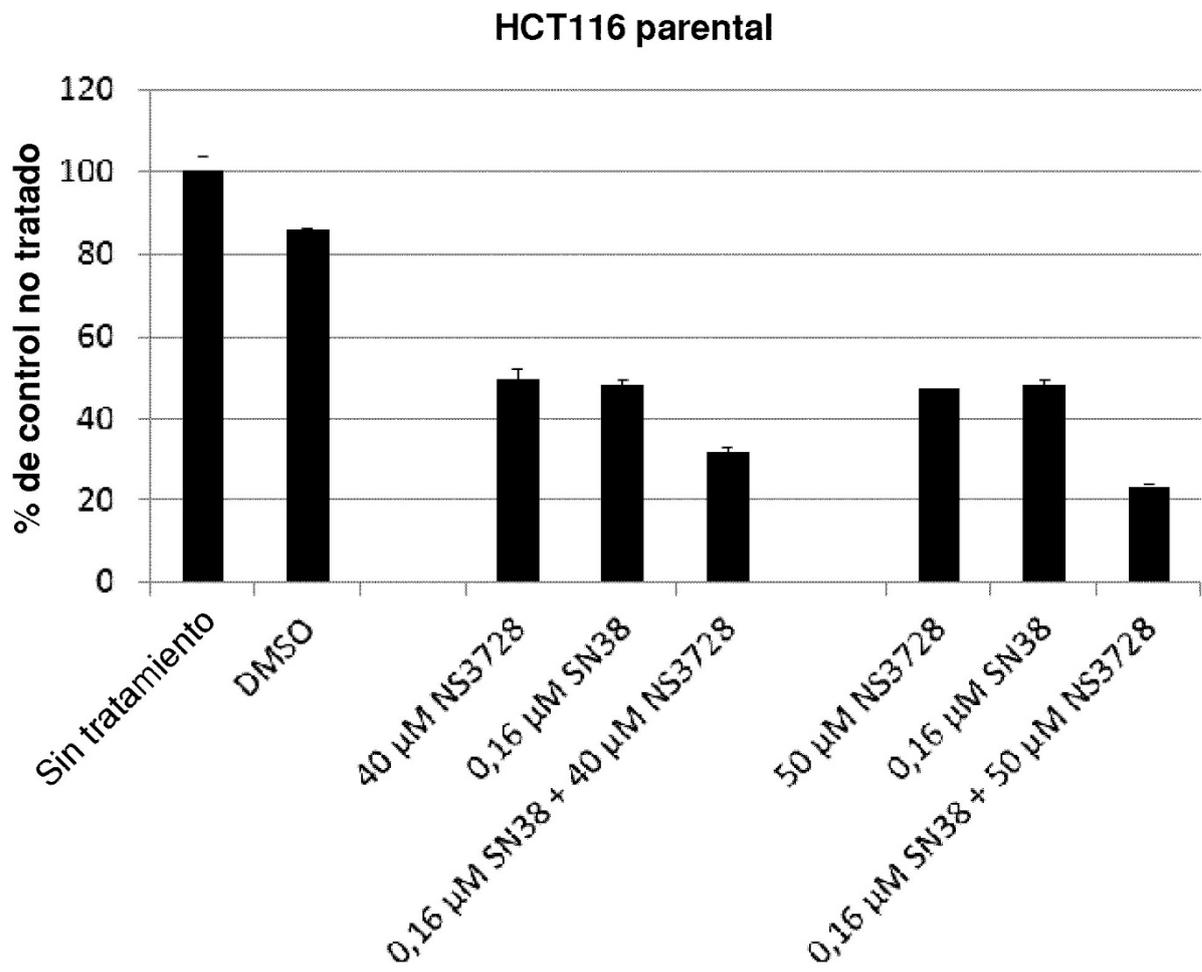


Fig. 9

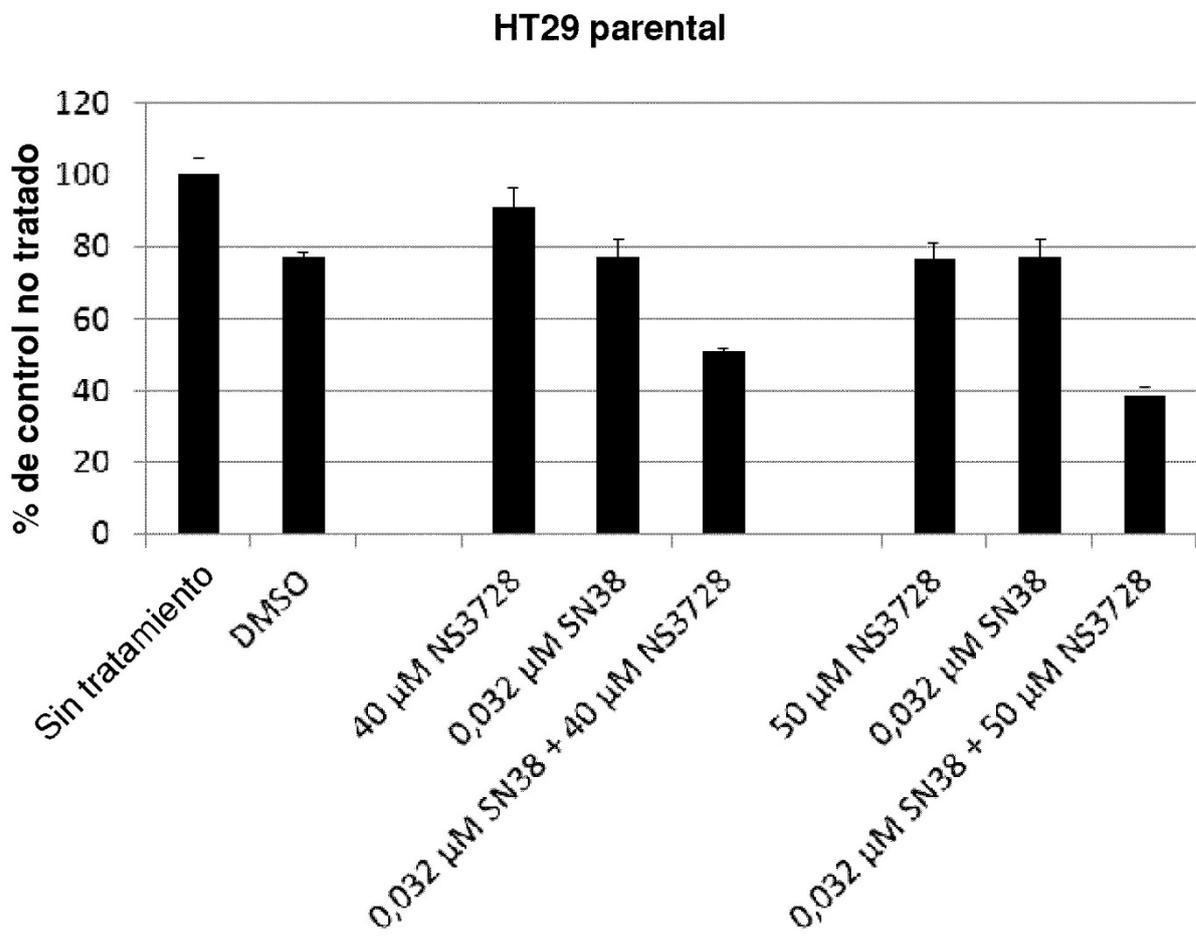


Fig. 10

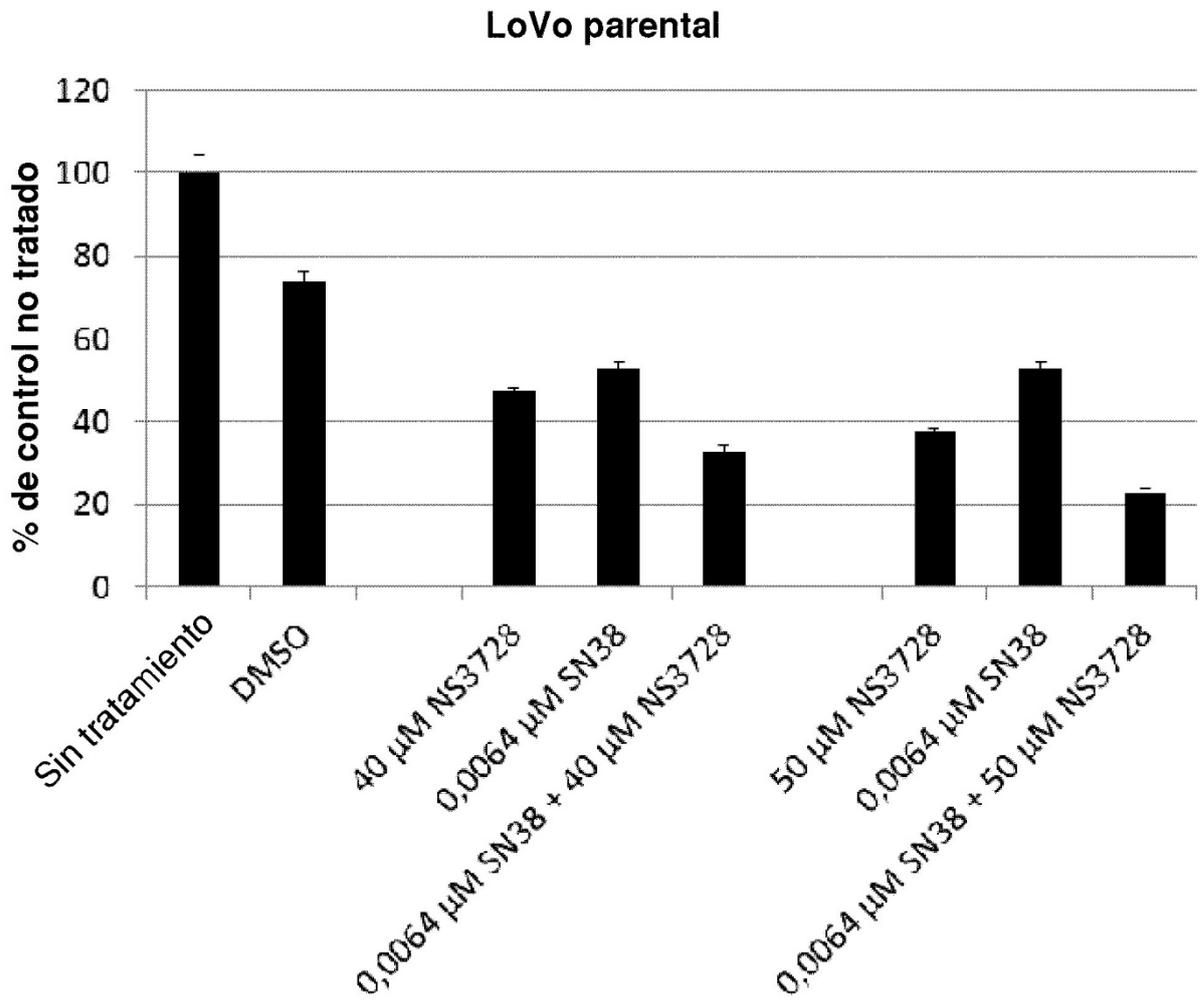


Fig. 11

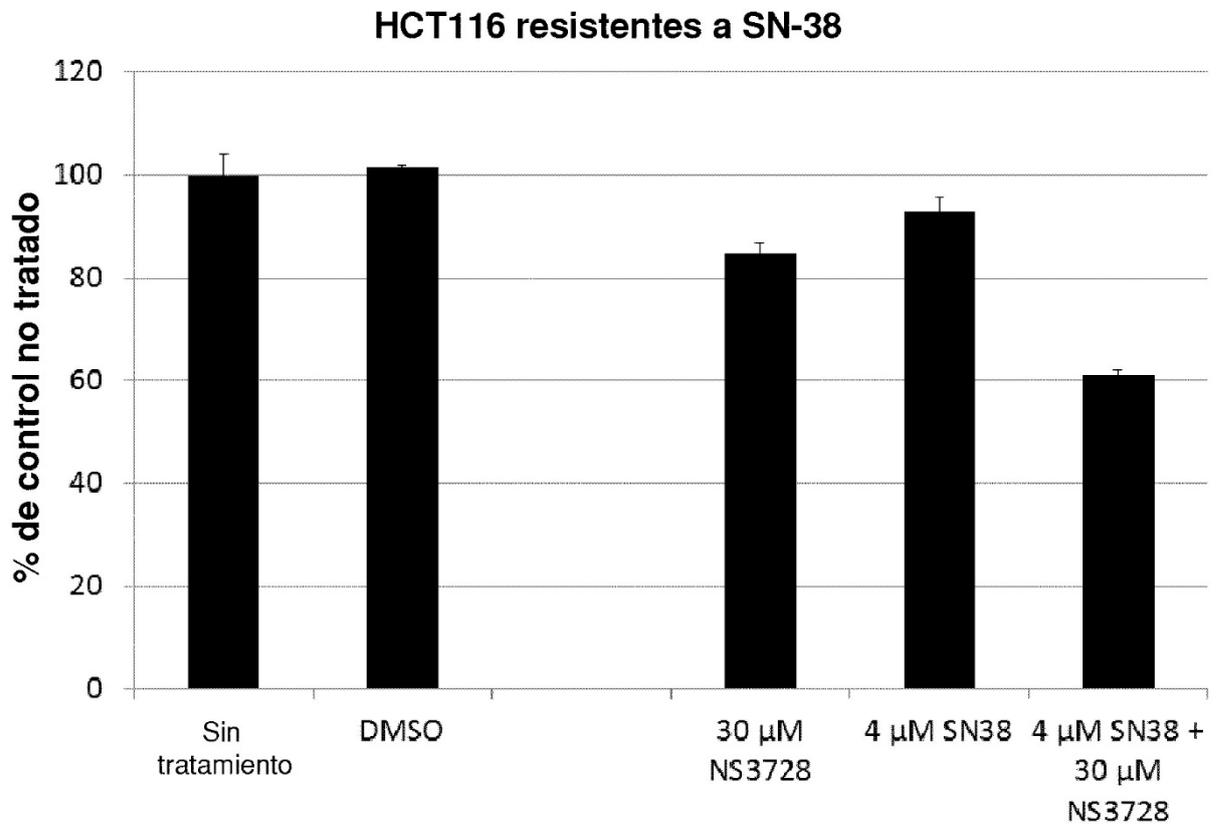


Fig. 12

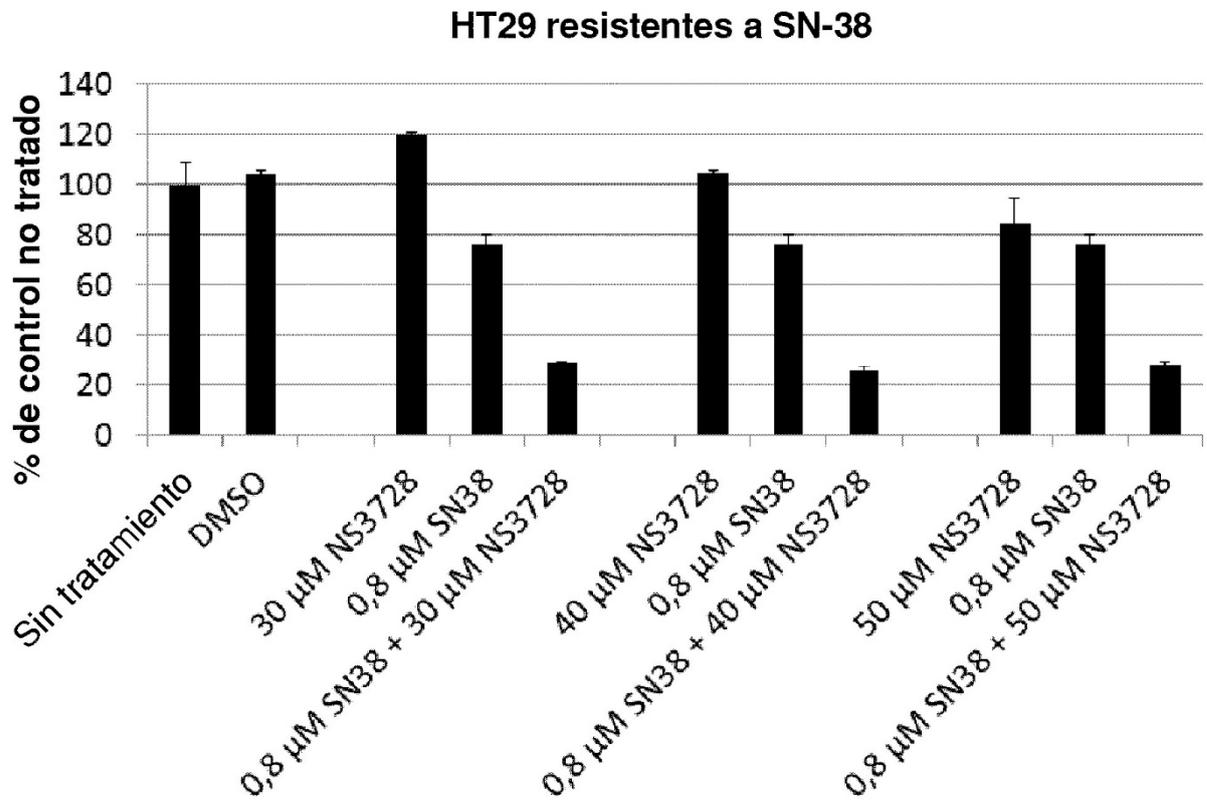


Fig. 13

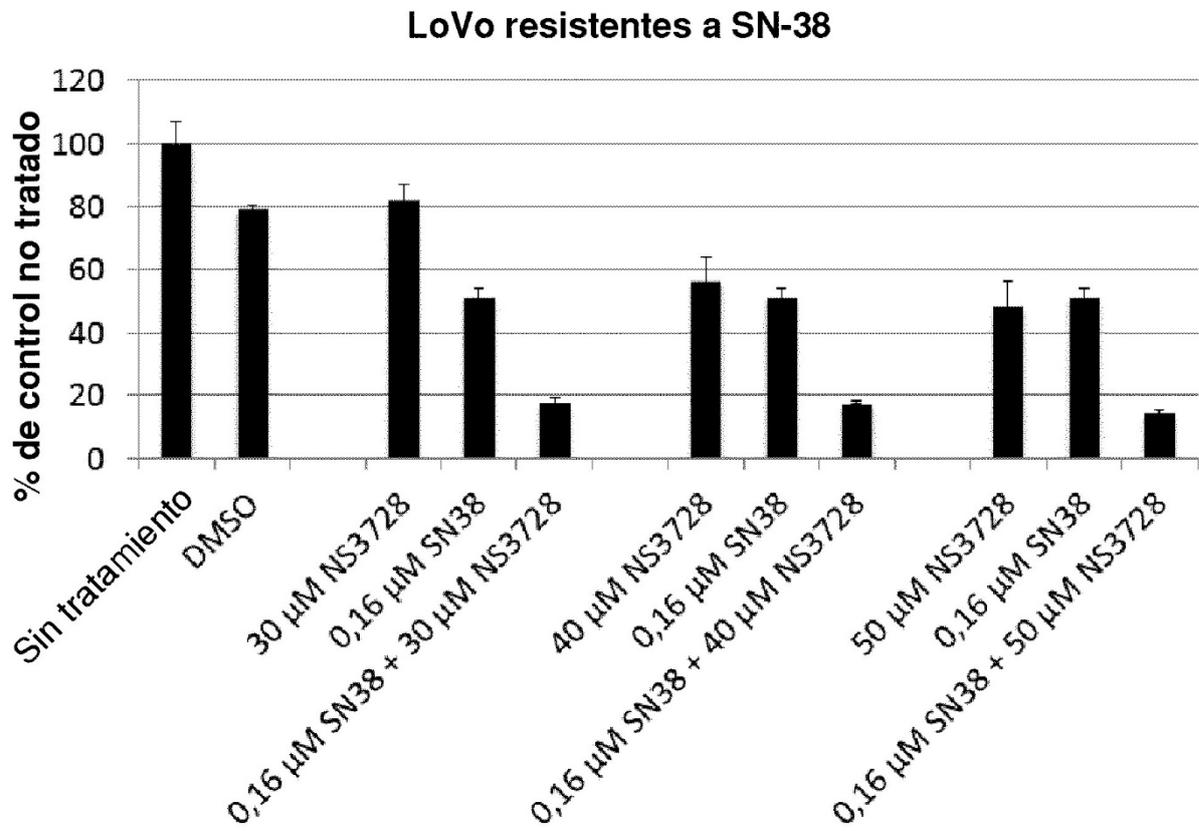


Fig. 14

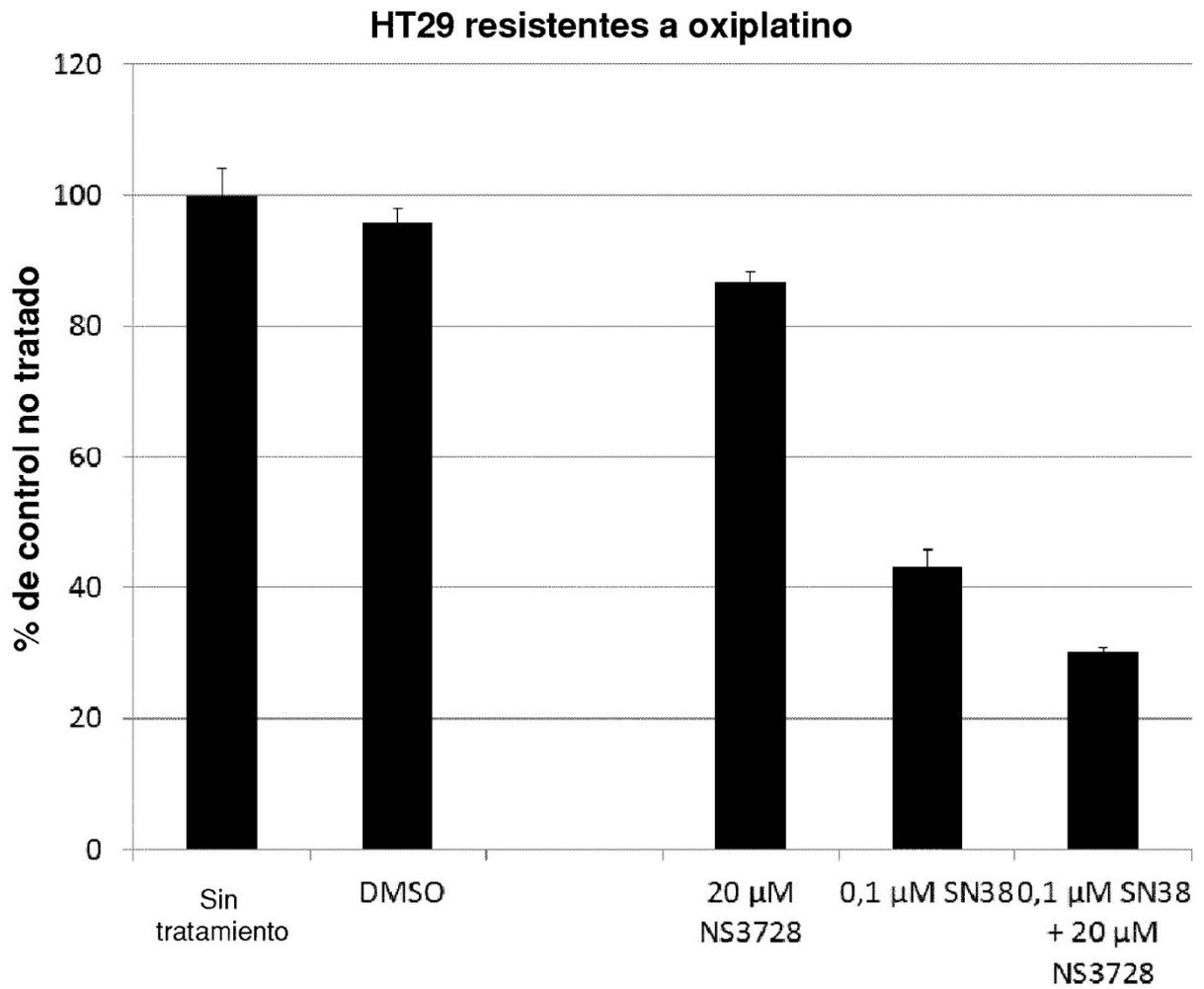


Fig. 15

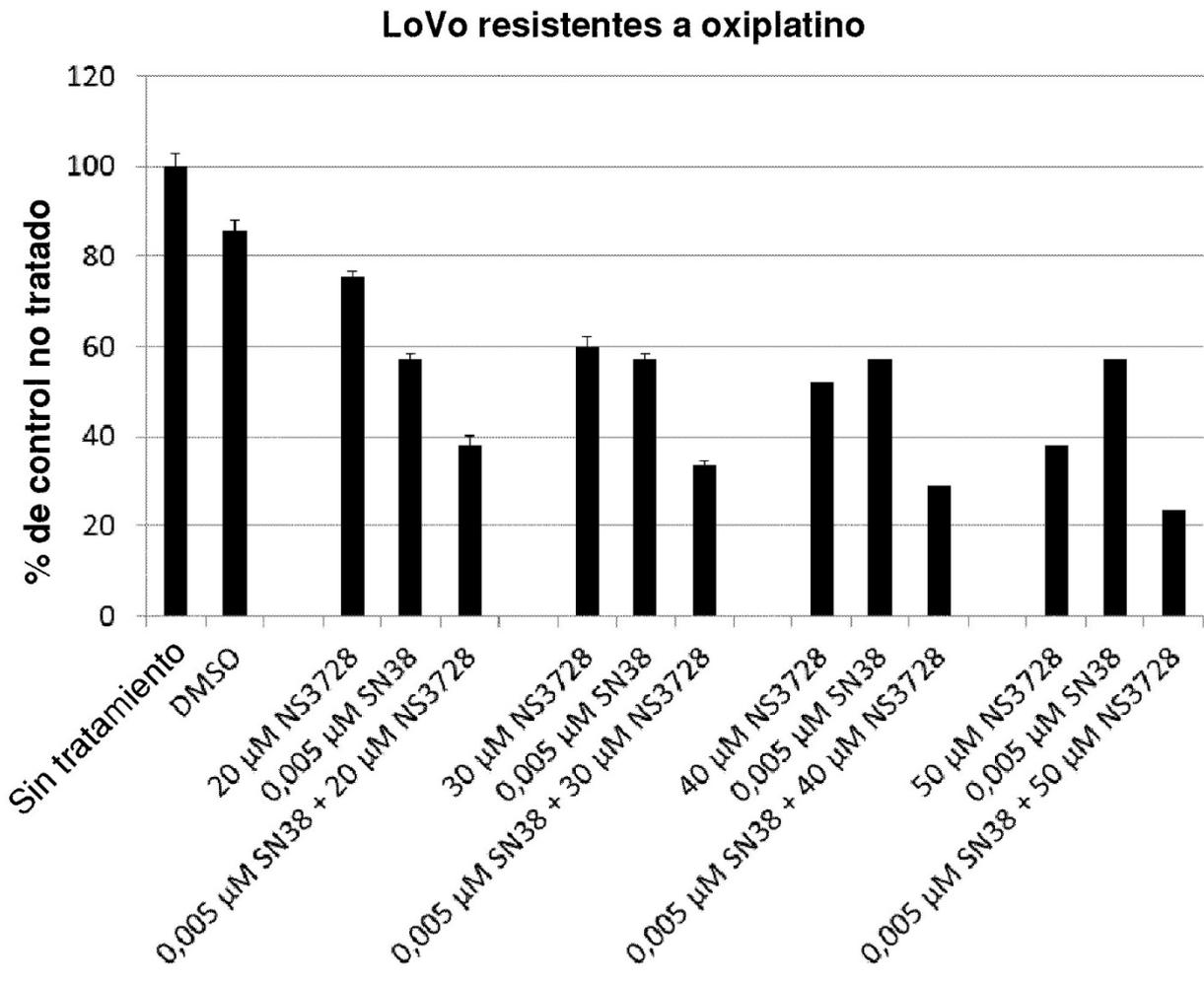


Fig. 16

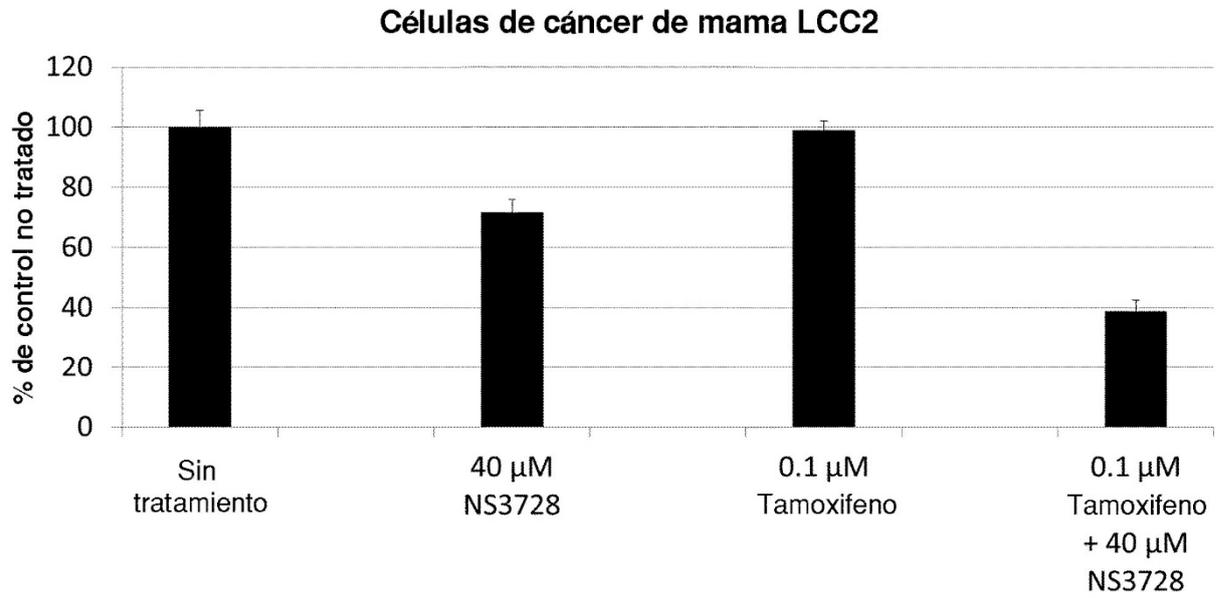


Fig. 17

