



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 778 933

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61K 33/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 21.12.2016 PCT/GB2016/054018

(87) Fecha y número de publicación internacional: 29.06.2017 WO17109486

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 21.12.2016 E 16820005 (3)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 04.03.2020 EP 3393478

(54) Título: Terapia de combinación

(30) Prioridad:

23.12.2015 WO PCT/GB2015/054158 03.06.2016 GB 201609770

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 12.08.2020

(73) Titular/es:

NUCANA PLC (100.0%) 3 Lochside Way, Edinburgh EH12 9DT, GB

(72) Inventor/es:

GRIFFITH, HUGH

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación

Esta invención se refiere a una combinación de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato (nombre químico: 2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O-[fenilo (benzoxi-L-alaninil)] fosfato) (NUC-1031) y un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado entre cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino.

Antecedentes

NUC-1031

10

15

20

25

30

35

45

50

55

Gemcitabina1; comercializado como Gemzar®) es un análogo de nucleósido eficaz que actualmente está aprobado para tratar los cánceres de mama, pulmón de células no pequeñas, ovario y páncreas y se usa ampliamente para tratar una variedad de otros tipos de cáncer, como el de vejiga, biliar, colorrectal y linfoma.

La utilidad clínica de la gemcitabina está limitada por una serie de mecanismos de resistencia inherentes y adquiridos. A nivel celular, la resistencia depende de tres parámetros: (i) la baja regulación de la desoxicitidina quinasa, necesaria para la activación en el resto fosforilado; (ii) la expresión reducida de transportadores de nucleósidos, en particular, hENT1 requerida para la absorción por las células cancerosas; y (iii) la regulación al alza de enzimas catalíticas, especialmente citidina desaminasa que degrada la gemcitabina.

WO2005/012327 describe una serie de análogos de nucleótidos para gemcitabina y moléculas de fármacos nucleósidos relacionados. Entre ellos gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato (NUC-1031; 2) se identifica como un compuesto particularmente eficaz. Estos protides evitan muchos de los mecanismos de resistencia inherentes y adquiridos que limitan la utilidad de la gemcitabina ('La aplicación de la tecnología ProTide a la gemcitabina: un enfoque exitoso para superar los mecanismos clave de resistencia al cáncer conduce a un nuevo agente (NUC-1031) en el desarrollo clínico'; Slusarczyk y otros; J. Med. Chem.; 2014, 57, 1531-1542).

40 NUC-1031 2 se prepara típicamente como una mezcla de dos diastereoisómeros, epiméricos en el centro de fosfato (el S-epímero 3 y el R-epímero 4), que se pueden separar y administrar como un solo epímero.

ProGem1 fue un estudio de dos etapas abierto, por primera vez en humanos (FTIH), fase I, abierto para investigar la seguridad, tolerabilidad, eficacia clínica, farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) de NUC-1031 administrado en dos horarios de dosificación en sujetos con neoplasias malignas sólidas avanzadas (número EudraCT: 2011-005232-26). Los sujetos tenían los siguientes tipos de tumores al ingreso al estudio: cáncer colorrectal (7 sujetos), primario desconocido (3), cáncer de ovario (12), cáncer de mama (4), cáncer de páncreas (9), colangiocarcinoma (7), cáncer de endometrio (3)), cáncer de cuello uterino (2), cáncer de pulmón (7), mesotelioma (3), cáncer de esófago (3), cáncer de las trompas de Falopio (1), trofoblasto (1), cáncer renal (1), cáncer gástrico (1), cáncer anal (1), cáncer de timo (1) y osteosarcoma (1). El estudio confirmó la actividad antitumoral de NUC-1031 en pacientes con cánceres progresivos avanzados, que han agotado todas las opciones terapéuticas estándar, muchas de las cuales eran resistentes o refractarias a la terapia previa con análogos de nucleósidos, incluida la gemcitabina. De particular interés, los datos farmacocinéticos mostraron que NUC-1031 como agente único genera una concentración intracelular máxima alrededor de 10 veces mayor (C_{max}) del resto trifosfato activo (dFdCTP) que el agente único gemcitabina a dosis equimolar. Además, la exposición intracelular en el tiempo o Área bajo la curva (AUC) a dFdCTP, fue 27 veces mayor para NUC-1031 en comparación con los datos históricos de gemcitabina de varios estudios publicados. Finalmente, los análisis revelaron que NUC-1031 libera menos de la mitad de los niveles del metabolito potencialmente tóxico 2', 2'-difluoro-2'-desoxiuridina (dFdU) normalmente asociado con gemcitabina.

Cáncer del tracto biliar

5

10

15

20

25

30

35

45

50

55

60

65

Los cánceres del tracto biliar (BTC) están asociados con una alta tasa de mortalidad (aproximadamente 23 por millón de habitantes con una incidencia de 0,7% de tumores malignos en adultos, *es decir* aproximadamente 1200 nuevos casos registrados en Inglaterra y Gales por año. Los cánceres del tracto biliar se subclasifican con respecto al sitio de origen como:

- Cáncer de vesícula biliar
- · Conducto biliar distal
- 40 Tumores ampulares
 - Colangiocarcinoma intrahepático
 - Colangiocarcinoma de Hilar (Klatskin)

Estos cánceres son más frecuentes en pacientes entre 50 y 70 años, con una mayor incidencia en varones en el caso de colangiocarcinoma y carcinomas ampulares, y en mujeres para cánceres de vesícula biliar. Aunque más del 90% de los BTC son adenocarcinomas, es posible encontrar otros subtipos histológicos, como tumores escamosos, neuroendocrinos, linfomas o sarcomas. Los principales factores etiológicos para BTC son cálculos biliares, anomalías congénitas de los conductos biliares, colangitis esclerosante primaria, enfermedades hepáticas crónicas y síndromes de poliposis hereditaria.

La cirugía ofrece la única posibilidad de cura a largo plazo; sin embargo, debido a la naturaleza agresiva de BTC, la mayoría de los pacientes (> 65%) son diagnosticados en etapas avanzadas cuando no es factible la cirugía y cuando la quimioterapia paliativa es el único tratamiento disponible. El pronóstico de los pacientes diagnosticados con cáncer avanzado (enfermedad metastásica o irresecable localmente avanzada) del tracto biliar es pobre. La supervivencia general a cinco años para los estadios III y IV es del 10% y 0%, respectivamente. Sin embargo, la quimioterapia doblete de primera línea ha mostrado una mejora en la supervivencia general y la calidad de vida en comparación con la terapia con un solo agente.

Los medicamentos de quimioterapia más activos para el tratamiento de BTC son gemcitabina, fluoropirimidinas y agentes de platino. El estudio NCRN ABC-02 del Reino Unido estableció el cisplatino y la gemcitabina como el régimen de referencia para el tratamiento de primera línea de pacientes con BTC. Los resultados de este estudio aleatorizado de fase III con 410 pacientes que compararon quimioterapia doble cisplatino/gemcitabina sobre la monoterapia con gemcitabina, demostraron ventaja en la supervivencia general (mediana 11,7 vs. 8,1 meses; p<0,001) y en la supervivencia libre de

progresión (mediana 8 vs. 5 meses; p<0,001). Se observó una magnitud de beneficio muy similar en un estudio japonés aleatorizado de fase II que usa los mismos regímenes de tratamiento (el estudio BT-22) donde se documentó una mediana de supervivencia de 11,2 meses con cisplatino/gemcitabina. La solidez del estudio ABC-02 dado su tamaño y la ventaja de supervivencia observada ha establecido la combinación de cisplatino y gemcitabina como el estándar de atención y desde entonces ha sido ampliamente adoptado en el Reino Unido e internacionalmente (por ejemplo, las pautas de NCCN en EE. UU.).

Es un objetivo de esta invención proporcionar una terapia combinada para tratar el cáncer. Es un objetivo de ciertas realizaciones de esta invención proporcionar una terapia que sea más efectiva que los tratamientos existentes.

Ciertas modalidades de la presente invención satisfacen algunos o todos los objetivos anteriores.

Resumen de la descripción

5

10

30

- De acuerdo con la presente invención, se proporciona gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento del cáncer en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino.
- La invención también proporciona gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino. La combinación generalmente se utilizará en el tratamiento del cáncer.
- La invención también proporciona un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
 - La invención también proporciona un método para tratar el cáncer, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino.
 - La invención también proporciona gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino para usar en el fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
 - La invención también proporciona gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino.
- La invención también proporciona un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado entre cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino para usar en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en combinación con gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o un sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
- La invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agente anticancerígeno a base de
 platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino, y al menos un excipiente farmacéuticamente
 aceptable.
- La formulación puede contener una dosis unitaria de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato y una dosis unitaria del agente anticancerígeno a base de platino. Las dosis unitarias pueden ser las mismas pero típicamente serán diferentes.
 - La invención también proporciona dos formulaciones separadas para usarse juntas, siendo las formulaciones:
- una primera formulación que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y
 - una segunda formulación que comprende un agente anticancerígeno basado en platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- La formulación puede tener forma de kit. Las formulaciones (es decir, el kit que comprende dichas formulaciones) serán típicamente para tratar el cáncer.
- Los tratamientos de la presente invención se basan en el hecho de que la combinación de los dos agentes (es decir, gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato y el agente anticancerígeno a base de platino) muestran una mayor eficacia cuando se administran en combinación que es el caso cuando cualquiera se administra solo. El término "en combinación" o "juntos" en el contexto de la presente invención se refiere al hecho de que los dos agentes se administran al mismo

paciente durante el período de tratamiento. La administración puede ser separada en el sentido de proporcionarse en dosis separadas o puede ser en la misma dosis. La administración puede tener lugar simultáneamente o en secuencia, ya sea inmediatamente uno después del otro o con un intervalo de tiempo entre la administración de los dos agentes. El término "solo" en el contexto de esta discusión significa, por lo tanto, la administración de un solo agente activo y ninguna administración del otro agente durante el período de tratamiento, incluso después de un intervalo de tiempo.

La terapia combinada de acuerdo con la invención abarca la administración conjunta o la administración secuencial de los dos agentes activos de una manera que mejora el resultado terapéutico global en relación con la administración de uno de los agentes activos solo durante el período de tratamiento general. Las formulaciones farmacéuticas empleadas para este propósito pueden ser individuales, es decir formulaciones separadas, o presentadas en una sola formulación. La o cada formulación puede estar en forma líquida, diluida o lista para la dilución, o puede estar en forma sólida. Se pueden proporcionar formas sólidas para su disolución en un medio disolvente adecuado. Las formas sólidas también se pueden presentar en forma de dosis unitaria concentrada como comprimidos, cápsulas losanges, etc.

- En particular, los presentes inventores han encontrado que el cisplatino sensibiliza ciertas líneas celulares de cáncer, por ejemplo, la línea celular de cáncer de vejiga HT1376, a NUC-1031 en un fuerte efecto sinérgico. Además, los inventores han descubierto que, in vivo, la combinación de NUC-1031 y cisplatino conduce a un aumento de la t intracelular_{1/2} de dFdCTP y han demostrado que la combinación puede ser eficaz en el tratamiento de cánceres del tracto biliar.
- La sinergia observada para gemcitabina y platinos se ha atribuido a un aumento de 1,5 veces en los niveles de dFdCTP (gemcitabina trifosfato), el metabolito activo de gemcitabina y NUC-1031 (van Moorsel et al., British Journal of Cancer, 1999, 80 (7), 981-990), que se ha descrito como el resultado de una actividad mejorada de desoxicitidina quinasa (dCK). Cuando se combina con gemcitabina, se han sugerido dos mecanismos basados en platino para aumentar los niveles de dFdCTP mediados por dCK. El primer mecanismo celular implica la inhibición de la ribonucleótido reductasa, la enzima responsable de la síntesis de trifosfato de desoxicitidina (dCTP), que se sabe que inhibe la dCK (Bajetta y otros., Annals of Oncology, 2003, 14, 242-247). En el segundo mecanismo molecular, el daño en el ADN inducido por el platino activa los procesos de reparación por escisión de nucleótidos, que requieren desoxirribonucleótidos (dNTP). A su vez, varias enzimas implicadas en la síntesis de dNTP están reguladas, incluyendo dCK (van Moorsel y col., 1999). NUC-1031 se sintetiza como un análogo de nucleótido, en forma de monofosfato, que evita la formación de dFdCTP dependiente de dCK y, por lo tanto, la sinergia observada al combinar NUC-1031 y cisplatino parece originarse a partir de una ruta diferente y aún desconocida

En ciertas modalidades preferidas, el agente anticancerígeno basado en platino es cisplatino.

- La gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede ser una mezcla de diastereoisómeros de fosfato o puede ser el (S)-epímero o como (*R*)-epímero en forma sustancialmente diastereoméricamente pura. 'Sustancialmente diastereoméricamente puro' se define para los propósitos de esta invención como una pureza diastereomérica de más de aproximadamente 90%. Si está presente como una forma sustancialmente diastereoisoméricamente pura, la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede tener una pureza diastereoisomérica de más del 95%, 98%, 99% o incluso 99,5%.
 - El cáncer puede ser un cáncer de tumor sólido. El cáncer puede ser un cáncer seleccionado entre: cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de vías biliares (por ejemplo, un cáncer seleccionado de cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar distal, cáncer de ampolla, colangiocarcinoma hilar y colangiocarcinoma intrahepático), cáncer de próstata, cáncer renal, linfoma, leucemia, cáncer cervical, cáncer de timo, un cáncer de origen primario desconocido, cáncer de esófago, mesotelioma, cáncer suprarrenal, cáncer de útero, cáncer de trompa de Falopio, endometrio cáncer, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del sistema nervioso central y tumores de células germinales.
- En ciertas modalidades preferidas, el cáncer se selecciona de cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de 50 células no pequeñas y cáncer del tracto biliar (p.ej un cáncer seleccionado de cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar distal, cáncer ampular, colangiocarcinoma hiliar y colangiocarcinoma intrahepático). En ciertas modalidades preferidas, el cáncer se selecciona de cáncer de vejiga, cáncer de ovario y cáncer del tracto biliar (p.ej un cáncer seleccionado de cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar distal, cáncer ampular, colangiocarcinoma hiliar y colangiocarcinoma intrahepático). En ciertas modalidades preferidas, el cáncer es un cáncer del tracto biliar. En otras 55 modalidades preferidas, el cáncer es un cáncer de veijaa. Las combinaciones en las que el agente anticancer geno basado en platino es cisplatino son particularmente preferidas para tratar estos cánceres particulares. En ciertas modalidades preferidas, el cáncer se selecciona de cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer del tracto biliar (por ejemplo un cáncer seleccionado de cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar distal, cáncer ampular, colangiocarcinoma hiliar y colangiocarcinoma intrahepático) y el agente anticancerígeno a base de platino es cisplatino. En ciertas modalidades preferidas, el cáncer se selecciona de cáncer de ovario y cáncer del tracto biliar (por ejemplo un 60 cáncer seleccionado de cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar distal, cáncer ampular, colangiocarcinoma hiliar y colangiocarcinoma intrahepático) y el agente anticancerígeno a base de platino es cisplatino. Por lo tanto, puede ser que el cáncer sea cáncer del tracto biliar y que el agente anticancerígeno a base de platino sea cisplatino. Del mismo modo, puede ser que el cáncer sea cáncer de vejiga y que el agente anticancerígeno a base de platino sea cisplatino.

65

45

5

El cáncer puede no haber sido tratado previamente con quimioterapia. Alternativamente, el cáncer (p.ej el tracto biliar o el cáncer de vejiga) pueden recaer. Por lo tanto, el cáncer puede haber recurrido o progresado después de uno o más ciclos anteriores de quimioterapia (que puede haber incluido o no el tratamiento con un agente seleccionado de cisplatino, gemcitabina o gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. El cancer (por ejemplo el tracto biliar o el cáncer de vejiga) pueden ser refractarios, resistentes o parcialmente resistentes al agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo cisplatino). Alternativamente, el cáncer (p.ej el tracto biliar o el cáncer de vejiga) pueden ser sensibles al agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo, cisplatino). El cáncer (por ejemplo el tracto biliar o el cáncer de vejiga) pueden ser metastásicos.

- Un solvato típicamente será un hidrato. Así, la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede estar en forma de una sal o hidrato, o un solvato (por ejemplo, hidrato) de una sal. Puede ser que la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato no esté en forma de sal y puede ser que no esté en forma de solvato o hidrato. Preferiblemente, la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato está en forma de base libre.
- Puede ser que la administración de la combinación proporcione un t intracelular_{1/2} de dFdCTP de más de 10 horas. Puede ser que la administración de la combinación proporcione un t intracelular_{1/2} de dFdCTP de más de 15 horas. Puede ser que la administración de la combinación proporcione un t intracelular_{1/2} de dFdCTP de más de 18 horas. Puede ser que la administración de la combinación proporcione un t intracelular_{1/2} de dFdCTP de más de 20 horas.
- La gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato y el agente anticancerígeno a base de platino pueden administrarse simultáneamente o pueden administrarse secuencialmente. Cuando se administran simultáneamente, se pueden administrar en una sola formulación o se pueden administrar en formulaciones separadas. Cuando se administran secuencialmente, se pueden administrar el mismo día o se pueden administrar en días separados durante el período de tratamiento. Puede ser que en ciertos días durante el período de tratamiento, la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]fosfato y el agente anticancerígeno a base de platino se administren simultáneamente o el mismo día y en ciertos otros días en el tratamiento programa se administra uno solo de los agentes.

Formulaciones NUC-1031

45

50

60

65

- 30 La gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Preferiblemente, la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato se administra por vía intravenosa.
- La gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede administrarse por vía parenteral como una formulación acuosa que opcionalmente también comprende un disolvente orgánico polar, *por ejemplo* DMA. En el caso de parenteral (*por ejemplo* administración intravenosa), la formulación preferiblemente también comprende un disolvente orgánico aprótico polar, *por ejemplo* DMA.
- La gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede estar comprendida en una formulación. La formulación puede ser para dilución en una cantidad predeterminada poco antes de la administración. *es decir* hasta 48 horas (*por ejemplo* hasta 24, 12 o 2 horas) antes de la administración.
 - La formulación también puede comprender uno o más solubilizantes farmacéuticamente aceptables, *por ejemplo* solubilizadores no iónicos farmacéuticamente aceptables. Los solubilizadores también pueden denominarse tensioactivos o emulsionantes. Los solubilizadores ilustrativos incluyen ácidos grasos polietoxilados y ésteres de ácidos grasos y mezclas de los mismos. Los solubilizadores adecuados pueden ser o comprender aceite de ricino polietoxilado (*por ejemplo* que se vende con el nombre comercial Kolliphor® ELP); o puede ser o comprender ácido hidroxiesteárico polietoxilado (*por ejemplo* que se vende con los nombres comerciales Solutol® o Kolliphor® HS15); o puede ser o comprender polietoxilado (*por ejemplo* monooleato de sorbitán de polioxietileno (20) (por ejemplo, el vendido bajo el nombre comercial Tween® 80).
 - En ciertas realizaciones preferidas, la formulación comprende más de un solubilizante farmacéuticamente aceptable.
- La formulación también puede comprender un vehículo acuoso. La formulación puede estar lista para administrar, en cuyo caso típicamente comprenderá un vehículo acuoso.
 - Mientras que gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato se formula preferiblemente para administración parenteral *por ejemplo* para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular, en ciertas modalidades de la invención puede administrarse por vía oral. Las composiciones se formulan preferentemente para administración intravenosa. La administración puede ser a través de un Dispositivo de Administración Venosa Central (CVAD) o puede ser a través de una vena periférica.
 - La dosis total de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en una formulación adecuada para la administración será típicamente de 250 mg a 3 g, *por ejemplo* de 1 g a 2 g, *por ejemplo* aproximadamente 1,5 g.

Formulaciones de solución madre

Puede ser que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) represente el 30% o más en volumen de la formulación. Por lo tanto, puede ser que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) represente el 50% o más, por ejemplo, el 60% o más en volumen de la formulación. El disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) puede representar el 95% o menos en volumen de la formulación, por ejemplo, el 90% o menos. La formulación también puede comprender un vehículo acuoso (por ejemplo, solución salina). El vehículo acuoso puede estar presente en 50% o menos en volumen de la formulación, por ejemplo, 30% o menos en volumen de la formulación. Típicamente, el vehículo acuoso (por ejemplo, solución salina) representará 5% o más, por ejemplo, 10% o más, en volumen de la formulación.

Puede ser que la concentración de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en los solventes de la formulación sea de 500 mg o menos por ml. Puede ser que la concentración sea de 100 mg o más por ml. Preferiblemente, la concentración es de 200 mg a 300 mg, por ejemplo, de 225 mg a 275 mg, por ejemplo, aproximadamente 250 mg, por ml.

Ciertas formulaciones preferidas comprenden:

del 30% al 95% en volumen de DMA;

5

20

55

del 5% al 50% en volumen de vehículo acuoso; y

de 100 mg a 400 mg (por ejemplo, de 100 mg a 300 mg) por ml de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato.

Las formulaciones más preferidas comprenden:

del 70% al 90% en volumen de DMA;

25 del 10% al 30% en volumen de vehículo acuoso (por ejemplo, solución salina); y

de 200 mg a 300 mg por ml de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato.

Las formulaciones descritas en los cuatro párrafos anteriores, en los que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) está presente como un componente principal, puede ser para administrar (por ejemplo, por infusión o inyección) la formulación sin diluirla antes de dicha administración. Pueden, por ejemplo, ser para la administración a través de un CVAD. Cuando se administra a través de un CVAD, la formulación generalmente no se diluye.

Alternativamente, estas formulaciones pueden ser soluciones madre que se diluyen antes de su uso para formar una formulación adecuada para la administración, por ejemplo, a través de una vena periférica.

Formulaciones de soluciones tensioactivas

Puede ser que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) represente el 10% o más, por ejemplo, el 20% o más en volumen de la formulación. Por lo tanto, puede ser que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) represente el 80% o menos, por ejemplo, el 70% o menos en volumen de la formulación. El disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) puede representar el 55% o menos en volumen de la formulación. La formulación también puede comprender uno o más solubilizantes (por ejemplo, uno o más ácidos grasos polietoxilados). El uno o más solubilizantes pueden representar el 70% o menos en volumen de la formulación, por ejemplo, el 60% o menos en volumen de la formulación. Típicamente, el uno o más solubilizantes representarán el 20% o más, por ejemplo, el 35%, en volumen de la formulación. La formulación también puede comprender un vehículo acuoso, por ejemplo, en una cantidad del 1% al 15% en volumen o del 5% al 12% en volumen.

Puede ser que la concentración de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en los solventes de la formulación sea 200 mg o menos por ml, por ejemplo, 150 mg o menos o 130 mg o menos. Puede ser que la concentración sea de 40 mg o más por ml, por ejemplo, 60 mg o más. Preferiblemente, la concentración es de 70 mg a 120 mg por ml, por ejemplo, aproximadamente 100 mg por ml.

Ciertas formulaciones preferidas comprenden:

del 20% al 70% en volumen de DMA;

del 20% al 70% en volumen de solubilizante o solubilizantes; y

de 50 mg a 150 mg por ml de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. La formulación también puede comprender un vehículo acuoso, por ejemplo, en una cantidad de 1% a 15% en volumen.

Ciertas formulaciones particularmente preferidas comprenden:

del 30% al 60% en volumen de DMA;

del 10% al 35% en volumen de un primer solubilizante;

del 10% al 35% en volumen de un segundo solubilizante;

5 del 2% al 15% en volumen de un vehículo acuoso; y

de 50 mg a 150 mg por ml de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. El primer solubilizante puede ser un aceite de ricino polietoxilado (por ejemplo, el que se vende con el nombre comercial Kolliphor® ELP). El segundo solubilizador puede ser un monooleato de sorbitán polietoxilado (por ejemplo, el que se vende con el nombre comercial Tween® 80).

10

La formulación puede comprender:

del 35% al 50% en volumen de DMA;

del 15% al 30% en volumen del primer solubilizante;

del 15% al 30% en volumen del segundo solubilizante;

del 5% al 12% en volumen de un vehículo acuoso; y

20

de 50 mg a 150 mg por ml de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato.

Las formulaciones de soluciones tensioactivas descritas en los cinco párrafos anteriores, en los que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) está presente como un componente principal, se diluyen típicamente con un vehículo acuoso antes de la administración. Por lo general, se preparan a partir de las soluciones madre mencionadas anteriormente antes de diluirse aún más para la administración. Una vez diluidos, pueden administrarse a través de una vena periférica.

Estas formulaciones pueden formarse diluyendo una formulación de solución madre que no contiene solubilizantes con una solución que contiene solubilizantes.

30

35

40

25

Formulaciones de soluciones de infusión.

Puede ser que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) represente 0,1% o más, por ejemplo 0,5% o más o 1% o más en volumen de la formulación. Por lo tanto, puede ser que DMA represente 12% o menos, por ejemplo, 10% o menos u 8% o menos en volumen de la formulación. La formulación también puede comprender un vehículo acuoso (por ejemplo, solución salina o WFI). El vehículo acuoso puede estar presente en 99,5% o menos en volumen de la formulación, por ejemplo, 99% o 98% o menos en volumen de la formulación. Típicamente, el vehículo acuoso representará el 80% o más, por ejemplo, el 95% o más, en volumen de la formulación. La formulación también puede comprender uno o más solubilizantes (por ejemplo, uno o más ácidos grasos polietoxilados). El uno o más solubilizantes pueden presentarse en 12% o menos en volumen de la formulación, por ejemplo, 10% o menos u 8% o menos en volumen de la formulación. Típicamente, el uno o más solubilizantes estarán presentes en 0,1% o más, por ejemplo 0,5% o más o 1% o más, en volumen de la formulación.

Puede ser que la concentración de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en los solventes de la formulación sea 15,0 mg o menos por ml o 12,0 mg o menos por ml, por ejemplo, 10,0 mg o menos u 8 mg o menos por ml. Puede ser que la concentración sea de 1,0 mg o más por ml, por ejemplo, 2,0 mg o más. Preferiblemente, la concentración es de 2,5 mg a 12 mg por ml, por ejemplo, de 3 mg a 11 mg por ml.

Ciertas formulaciones preferidas comprenden:

50

del 0,1% a 10% en volumen de DMA;

del 0,1% a 10% en volumen de solubilizantes o solubilizantes;

55 del 85%

del 85% al 99% en volumen de vehículo acuoso: v

de 2,0 mg a 12,0 mg por ml de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato.

Ciertas formulaciones particularmente preferidas comprenden:

60

del 1% a 8% en volumen de DMA;

del 0,5% a 4% en volumen de un primer solubilizante;

del 0,5% a 4% en volumen de un segundo solubilizante;

del 85% al 99% en volumen de vehículo acuoso; y

de 2,0 mg a 12,0 mg por ml de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. El primer solubilizador puede ser un aceite de ricino polietoxilado (por ejemplo, el que se vende con el nombre comercial Kolliphor® ELP). El segundo solubilizador puede ser un monooleato de sorbitán polietoxilado (por ejemplo, el que se vende con el nombre comercial Tween® 80).

Las formulaciones de solución de infusión descritas en los cuatro párrafos anteriores, en los que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) está presente como un componente menor, típicamente se han preparado diluyendo una solución concentrada de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninilo] -fosfato con el vehículo acuoso hasta 48 horas antes de la administración. Dicha solución concentrada puede ser una solución de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en un disolvente aprótico polar (ver bajo el título 'formulación de solución madre' más arriba) una solución de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en una mezcla de un solvente aprótico polar y un solubilizante (ver bajo el título "formulación de solución de surfactante" arriba). Estas formulaciones en las que el disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) está presente como un componente menor se pueden administrar a través de una vena periférica. Las bajas concentraciones del disolvente aprótico polar (por ejemplo, DMA) en dichas formulaciones significan que tienden a no causar dolor en la administración periférica.

Kits

5

10

15

25

30

45

60

20 La invención proporciona un kit para tratar el cáncer, el kit comprende:

una primera formulación que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y una segunda formulación que comprende un agente anticancerígeno basado en platino y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En ciertas modalidades particulares, el kit puede comprender:

una primera formulación que comprende:

del 30% al 95% en volumen de DMA;

del 5% al 50% en volumen de vehículo acuoso: v

de 100 mg a 400 mg (por ejemplo, de 100 mg a 300 mg) por ml de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato;

una segunda formulación que comprende un agente anticancerígeno basado en platino y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y

40 una tercera formulación que comprende:

del 30% al 95% en volumen de DMA;

del 5% al 50% en volumen de vehículo acuoso.

La tercera formulación típicamente no comprenderá un activo. Por lo tanto, típicamente no comprenderá ni gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato ni un agente anticancerígeno a base de platino. La tercera formulación puede proporcionarse en dos recipientes separados o en un único recipiente.

El kit mencionado en los dos párrafos anteriores es útil cuando la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato se administra por vía intravenosa a través de un CVAD. El CVAD se lava con la tercera formulación antes de la administración de la primera formulación. Esto mitiga el riesgo de precipitación de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en o en la entrada del aparato de administración intravenosa, es *decir* el CVAD, evitando el contacto directo de la formulación activa con medios acuosos (por ejemplo, una solución salina de lavado). El CVAD también puede enjuagarse con la tercera formulación después de la administración de la primera formulación. Esto evita aún más la precipitación.

tercera formulación después de la administración de la primera formulación. Esto evita administración de la precipitación

En ciertas modalidades particulares, el kit puede comprender:

una primera formulación que comprende:

del 30% al 95% en volumen de DMA;

del 5% al 50% en volumen de vehículo acuoso; y

de 100 mg a 400 mg (por ejemplo, de 100 mg a 300 mg) por ml de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato;

una segunda formulación que comprende un agente anticancerígeno basado en platino y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y

una tercera formulación que comprende:

del 10% al 50% en volumen de DMA;

5

25

30

40

45

55

del 20% al 60% en volumen de un primer solubilizante;

10 del 20% al 60% en volumen de un segundo solubilizante.

> Típicamente, la tercera formulación no comprenderá ningún activo. Por lo tanto, típicamente no comprenderá ni gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato ni un agente anticancerígeno a base de platino.

El kit mencionado en los dos párrafos anteriores es útil cuando la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato se 15 administra por vía intravenosa a través de una vena periférica. La primera formulación se diluye con la tercera formulación hasta 48 h, por ejemplo, hasta 24 h antes de la administración para formar una cuarta formulación. La cuarta formulación se diluye adicionalmente con un vehículo acuoso antes de la administración a la concentración deseada para formar la formulación, que se usa administrada por infusión o inyección al paciente. Con el fin de lograr formulaciones para 20 administración periférica que sean estables con respecto a la precipitación de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]fosfato, normalmente es deseable incluir solubilizantes. Sin embargo, la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato puede ser propenso a la degradación en presencia de tales solubilizantes. Por lo tanto, un método de dilución de dos etapas es, en ciertas modalidades de la invención, el medio preferible por el cual se logran formulaciones de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para administración periférica.

Metodología ilustrativa para la administración de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato

Una metodología ilustrativa para la administración de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato es la siguiente: Se forma una solución de 250 mg/ml de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato (el epímero S, el epímero R o una mezcla de los mismos) en una mezcla de DMA 80:20 (en volumen) y solución salina al 0,9%. Esta formulación de solución madre es típicamente suficientemente estable para el almacenamiento a largo plazo y el transporte de protides. Esta formulación de solución madre se puede administrar a los pacientes por vía intravenosa a través de un CVAD (por ejemplo, una línea Hickman, línea PICC, Portacath), por ejemplo, a una velocidad de 20 ml/hora. El aparato de administración intravenosa típicamente se enjuagará con una mezcla 80:20 (en volumen) de DMA y solución salina al 0,9% (la Solución de Enjuague mencionada en el Ejemplo 4 a continuación) antes y después de la administración de la formulación que 35 comprende la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato. Esto ayuda a mitigar el riesgo de cualquier precipitación potencial de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en el aparato de administración intravenosa en contacto con la solución salina. Alternativamente, cuando la administración intravenosa en una vena periférica es el método preferido de administración, la formulación de la solución madre se diluye a 100 mg/ml con una solución diluyente que es 20%: 40%: 40% de mezcla de DMA: Tween® 80: Kolliphor ® ELP (por ejemplo, 6,7 ml de 250 mg/ml de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato en 80:20 DMA: se agrega solución salina al 0,9% a 10 ml de DMA: Tween®80: Kolliphor® ELP solución diluyente). La formulación resultante (solución de surfactante) es típicamente estable hasta por 5 días. La formulación de la solución de infusión se prepara diluyendo esta formulación de solución de tensioactivo a la concentración deseada con solución salina al 0,9%.

El fosfato de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)] administrado en el estudio ABC-08 descrito en los ejemplos se llevó a cabo utilizando esta metodología de administración, con el epímero S de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato administrado a través de una CVAD.

50 Formulaciones del agente anticancerígeno a base de platino

> El agente anticancerígeno a base de platino puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente o intramuscularmente. Preferiblemente, el agente anticancerígeno basado en platino se administra por vía intravenosa.

> El agente anticancerígeno a base de platino se administrará típicamente como una solución acuosa, por ejemplo, como una solución acuosa estéril de 1 mg/ml. La solución acuosa será típicamente una solución salina (por ejemplo solución salina al 0,9%). La solución acuosa también puede comprender manitol (por ejemplo a 10 mg/ml).

- Cuando el agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo, cisplatino) se administra a una dosis inferior a 50 mg/ml, 60 generalmente se administra como una infusión de una bolsa de 100-250 ml durante 15-60 minutos. Cuando el agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo, cisplatino) se administra a una dosis mayor o igual a 50 mg/ml, generalmente se administra como una infusión desde una bolsa de 250 a 500 ml durante 15 a 60 minutos.
- 65 Hay más información disponible sobre la administración de cisplatino, por ejemplo, en la etiqueta aprobada por la FDA de EE. UU. para Platinol®.

Regímenes de dosificación

Puede ser que el NUC-1031 se administre dos veces en un ciclo de 21 días. Puede ser que el agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo cisplatino) se administra dos veces en el ciclo de 21 días. En un régimen de dosificación preferido, NUC-1031 se administra el día 1 y el día 8 de un ciclo de 21 días. También puede ser que el agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo cisplatino) se administra el día 1 y el día 8 del ciclo de 21 días. Puede ser que NUC-1031 y el agente anticancerígeno a base de platino (por ejemplo cisplatino) se administran simultáneamente el día 1 y el día 8 de un ciclo de 21 días.

10

5

La dosis de NUC-1031 administrada en cada evento de administración está preferiblemente en el intervalo de 250 mg/m² hasta 1250 mg/m². La dosis de NUC-1031 administrada en cada evento de administración puede estar en el rango de 300 mg/m² hasta 1000 mg/m². La dosis de NUC-1031 administrada en cada evento de administración puede estar en el rango de 400 mg/m² hasta 900 mg/m², por ejemplo desde 600 mg/m² a 800 mg/m², o de 300 a 750 mg/m². La dosis de NUC-1031 administrada en cada evento de administración puede ser de aproximadamente 750 mg/m².

15

La dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) administrado en cada evento de administración puede ser de 10 mg/m² hasta 200 mg/m². La dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) administrado en cada evento de administración puede ser de 20 mg/m² hasta 100 mg/m². La dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) administrado en cada evento de administración puede ser de 20 mg/m² a 60 mg/m². La dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) administrado en cada evento de administración puede ser de 30 mg/m² hasta 90 mg/m².

25

20

Puede ser que la dosis de NUC-1031, o la dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino), o la dosis de ambos compuestos, permanece sustancialmente igual en cada ciclo de tratamiento. Por ejemplo, una dosis de NUC-1031 de aproximadamente 750 mg/m² por evento de administración, y una dosis de cisplatino de aproximadamente 50 mg/m² puede usarse en múltiples ciclos de tratamiento.

30

Alternativamente, puede ser que la dosis de NUC-1031, o la dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino), o la dosis de ambos compuestos, disminuye desde el primer ciclo de tratamiento hasta el segundo (o posterior) ciclo de tratamiento. Por ejemplo, la dosis de NUC-1031 administrada en cada evento de administración puede disminuir de aproximadamente 750 mg/m², en un primer ciclo de tratamiento, hasta aproximadamente 625 mg/m² en un segundo (o posterior) ciclo de tratamiento. La dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) puede disminuir de aproximadamente 90 mg/m² en un primer ciclo de tratamiento, hasta aproximadamente 60 mg/m² o a aproximadamente 50 mg/m² en un segundo (o posterior) ciclo de tratamiento.

35

40

Los regímenes de tratamiento adecuados pueden hacer uso de disminuciones (como se establece en el párrafo anterior) tanto en las dosis de NUC-1031 como en las dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) de un primer ciclo de tratamiento a un segundo (o posterior) ciclo de tratamiento. Por ejemplo, la dosis de NUC-1031 administrada en cada evento de administración puede disminuir de aproximadamente 750 mg/m², en un primer ciclo de tratamiento, hasta aproximadamente 625 mg/m² en un segundo (o posterior) ciclo de tratamiento, y la dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) puede disminuir de aproximadamente 90 mg/m² en un primer ciclo de tratamiento, hasta aproximadamente 60 mg/m²o a aproximadamente 50 mg/m² en un segundo (o posterior) ciclo de tratamiento.

45

En el caso de que la dosis de NUC-1031 disminuya de un primer a un segundo ciclo de tratamiento, o posterior, (como de aproximadamente 750 mg/m² por incidente de administración, hasta aproximadamente 625 mg/m² por incidente de administración), la dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) puede permanecer igual entre el primer y el segundo ciclo de tratamiento o los posteriores (por ejemplo, aproximadamente 50 mg/m² en cada ciclo).

50

En el caso de que la dosis de NUC-1031 permanezca constante de un primer a un segundo ciclo de tratamiento, o posterior (como aproximadamente 625 mg/m² por incidente de administración), la dosis del agente anticancerígeno a base de platino (*por ejemplo* cisplatino) puede disminuir entre el primer y el segundo ciclo de tratamiento o posteriores (por ejemplo, de 90 mg/m² en un primer ciclo de tratamiento, hasta aproximadamente 60 mg/m²o a aproximadamente 50 mg/m² en un segundo ciclo de tratamiento o posterior).

55

Se espera que el régimen de dosificación mencionado anteriormente proporcione un equilibrio en el que la toxicidad de cada uno de los componentes de la combinación esté en un nivel aceptable, aunque todavía se observe un beneficio terapéutico de la combinación.

60

65

Puede ser que el régimen de dosificación mencionado anteriormente proporcione una tasa de supervivencia mejorada en pacientes. Puede ser que proporcione una enfermedad estable en más del 50% de los pacientes. Puede ser que proporcione uno o más de los beneficios anteriores con un nivel aceptable de efectos secundarios. Puede ser que la dosis sea tal que el AUC de dFdCTP sea mayor para la combinación que para NUC-1031 administrado como un agente único.

Puede ser que la dosis sea tal que la proporción de AUC a C_{max} de dFdCTP es mayor para la combinación que para NUC-1031 administrado como un agente único.

Breve descripción de las figuras

5

Las modalidades de la invención se describen a continuación con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales:

La Figura 1 muestra el cromatógrafo para la separación de compuestos 3 y 4 por HPLC usando una columna Chiralpak AD y un sistema disolvente de gradiente n-heptano/IPA.

10

La Figura 2 muestra un efecto de sinergia que se muestra usando el método de cambio de curva para cisplatino/NUC-1031 en la línea celular de cáncer de vejiga HT1376

Descripción detallada

15

'Simultáneo' significa "sustancialmente simultáneo", por ejemplo, con menos de 30 minutos de diferencia. 'Secuencial' significa administración con más de 30 minutos de diferencia.

20

En esta especificación, el término epímero S o diastereoisómero S se refiere a gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato. Asimismo, a lo largo de esta especificación, el término epímero R o diastereoisómero R se refiere a gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato.

Los compuestos de la invención pueden obtenerse, almacenarse y/o administrarse en forma de una sal

25

30

farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico, y bromhídrico, o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como los ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, málico, cítrico, láctico, múcico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edetico, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico. Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, trometamina y zinc. También se pueden formar hemisaltos de ácidos y bases, por ejemplo, hemisulfato, hemioxalato y sales de hemicalcio. En ciertas modalidades, particularmente aquellas que se aplican al s-epímero, el compuesto está en forma de una sal de HCl o una sal de hemioxalato.

35

Los compuestos de la invención pueden existir en una forma cristalina única o en una mezcla de formas cristalinas o pueden ser amorfos. Por lo tanto, los compuestos de la invención destinados a uso farmacéutico pueden administrarse como productos cristalinos o amorfos. Estos se pueden obtener, por ejemplo, como películas, polvos o tapones sólidos por métodos tales como la precipitación, cristalización, liofilización, o secado por pulverización, o secado por evaporación. El secado por microondas o radio frecuencia se puede usar para este propósito.

40

Para los compuestos de la invención mencionados anteriormente, la dosis administrada variará, por supuesto, con el

Para los compuestos de la invención mencionados anteriormente, la dosis administrada variará, por supuesto, con el compuesto empleado, el modo de administración, el tratamiento deseado y el trastorno indicado. Por ejemplo, si el compuesto de la invención se administra por vía parenteral, entonces la dosificación del compuesto de la invención puede estar en el intervalo de 0,1 a 5 g/m², por ejemplo, de 0,5 a 2 g/m². El tamaño de la dosis para fines terapéuticos de los compuestos de la invención variará naturalmente de acuerdo con la naturaleza y severidad de las condiciones, la edad y el sexo del animal o paciente y la ruta de administración, de acuerdo con principios bien conocidos de la medicina.

50

Se espera que los niveles de dosificación, la frecuencia de la dosis y la duración del tratamiento de los compuestos de la invención difieran dependiendo de la formulación y la indicación clínica, la edad y las condiciones médicas comórbidas del paciente.

55

Un compuesto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, puede usarse por sí solo, pero generalmente se administrará en forma de una composición farmacéutica en la que los compuestos de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se asocian a un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas se describen, por ejemplo, en, "Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Designs", M. E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988.

60

Dependiendo del modo de administración de los compuestos de la invención, la composición farmacéutica que se usa para administrar los compuestos de la invención comprenderá preferentemente de 0,05 a 99 % en peso (porcentaje en peso) de compuestos de la invención, más preferentemente de 0,05 % a 80 % en peso de compuestos de la invención, aún más preferentemente de 0,10 a 70 % en peso de compuestos de la invención, e incluso más preferentemente de 0,10 a 50 % en peso de los compuestos de la invención, todos los porcentajes en peso se basan en la composición total.

Para la administración oral, los compuestos de la invención se pueden mezclar con un adyuvante o un vehículo, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol; un almidón, por ejemplo, almidón de patata, almidón de maíz o amilopectina; un derivado de celulosa; un aglutinante, por ejemplo, gelatina o polivinilpirrolidona; y/o un lubricante, por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de calcio, polietilenglicol, cera, parafina y similares, y a continuación se comprimen en tabletas. Si se requieren tabletas recubiertas, los núcleos, preparados como se describe anteriormente, pueden recubrirse con una solución de azúcar concentrada, que puede contener, por ejemplo, goma arábiga, gelatina, talco y dióxido de titanio. Alternativamente, la tableta puede recubrirse con un polímero adecuado disuelto en un solvente orgánico fácilmente volátil.

- Para la preparación de cápsulas de gelatina blanda, los compuestos de la invención pueden mezclarse, por ejemplo, con un aceite vegetable o polietilenglicol. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener gránulos del compuesto mediante el uso de los excipientes mencionados anteriormente para tabletas. También las formulaciones líquidas o semisólidas del compuesto de la invención se pueden rellenar en cápsulas de gelatina dura.
- Las preparaciones líquidas para aplicación oral pueden estar en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo, soluciones que contienen el compuesto de la invención, el resto es azúcar y una mezcla de etanol, agua, glicerol y propilenglicol. Opcionalmente dichas preparaciones líquidas pueden contener agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes (como la sacarina), agentes conservantes y/o carboximetilcelulosa como agente espesante u otros excipientes conocidos por los expertos en la técnica.

Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa), los compuestos pueden administrarse como una solución acuosa u oleosa estéril. Los compuestos de la invención son muy lipofílicos. Las formulaciones acuosas típicamente, por lo tanto, también contendrán un disolvente orgánico polar farmacéuticamente aceptable.

- El tamaño de la dosis para fines terapéuticos de los compuestos de la invención variará naturalmente de acuerdo con la naturaleza y severidad de las condiciones, la edad y el sexo del animal o paciente y la ruta de administración, de acuerdo con principios bien conocidos de la medicina.
- Se espera que los niveles de dosificación, la frecuencia de la dosis y la duración del tratamiento de los compuestos de la invención difieran dependiendo de la formulación y la indicación clínica, la edad y las condiciones médicas comórbidas del paciente.
- La presente invención también incluye todas las formas farmacéuticamente aceptables marcadas isotópicamente de compuestos 2, 3 o 4 en el que uno o más átomos son reemplazados por átomos que tienen el mismo número atómico, pero una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa del isótopo predominante que generalmente se encuentra en la naturaleza.
 - Los ejemplos de isótopos adecuados para su inclusión en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, tales como ²H y ³H, carbono, tal como ¹¹C, ¹³C y ¹⁴C, cloro, tal como ³⁶Cl, flúor, tal como ¹⁸F, yodo, tal como ¹²³l y ¹²⁵l, nitrógeno, tal como ¹³N y ¹⁵N, oxígeno, tal como ¹⁵O, ¹⁷O y ¹⁸O, fósforo, tal como ³²P y azufre, tal como ³⁵S.
 - Ciertos compuestos marcados con isótopos, por ejemplo, los que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en los estudios de distribución de fármacos y/o substratos en los tejidos. Los isótopos radioactivos de tritio, es decir, ³H, y carbono-14, es decir ¹⁴C, son particularmente útiles para este propósito en vistas de su fácil incorporación y rápidos medios de detección.
 - La sustitución por isótopos más pesados como el deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una vida media *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos, y por lo tanto puede preferirse en algunas circunstancias.
- La sustitución por isótopos emisores de positrones, como ¹¹C, ¹⁸ F, ¹⁵O y ¹³N, puede ser útil en estudios de topografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.
- Los compuestos marcados isotópicamente pueden prepararse generalmente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos usando un reactivo marcado isotópicamente apropiado en lugar del reactivo no marcado previamente empleado.
 - El método de tratamiento o el compuesto para usar en el tratamiento del cáncer puede incluir, además de la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato y el compuesto anticancerígeno a base de platino, cirugía convencional o radioterapia o quimioterapia. Tal quimioterapia puede incluir la administración de uno o más de otros agentes activos.

Por lo tanto, cada una de las formulaciones farmacéuticas puede comprender otro agente activo.

- El uno o más agentes activos adicionales pueden ser una o más de las siguientes categorías de agentes antitumorales:
- (i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, tales como agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, bendamustin, melphalan, clorambucil, busulphan, temozolamida y

60

20

40

45

nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo, gemcitabina y antifolatos como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, pemetrexed, arabinósido de citosina e hidroxiurea); agentes antimitóticos (por ejemplo alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere e inhibidores de la policoquinasa); inhibidores de proteasoma, por ejemplo carfilzomib y bortezomib; terapia con interferón; e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán, mitoxantrona y camptotecina);

- (ii) agentes citostáticos como los antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), antiandrógenos (por ejemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo, goserelina, leuprorelina y buserelina), progestágenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5α-reductasa tal como finasteride:
- (iii) agentes anti-invasión, por ejemplo, dasatinib y bosutinib (SKI-606), e inhibidores de la función del receptor del activador del plasminógeno de la uroquinasa o anticuerpos contra la heparanasa;
 - (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento: por ejemplo, cuentos como inhibidores incluyen anticuerpos contra el factor de crecimiento y anticuerpos del receptor del factor de crecimiento, por ejemplo, el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin ™], el anticuerpo anti-EGFR panitumumab, el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab, inhibidores de la tirosina quinasa, por ejemplo, inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, inhibidores de la tirosina quinasa de la familia EGFR tal como gefitinib, erlotinib y 6-acrilamido-N -(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3morfolinopropoxi) -quinazolin-4-amina (Cl 1033), inhibidores de la tirosina quinasa erbB2 tales como lapatinib); inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos; inhibidores de la familia del factor de crecimiento de la insulina; moduladores de proteínas reguladoras de la apoptosis celular (por ejemplo, inhibidores de Bcl-2); inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas tal como imatinib y/o nilotinib (AMN107); inhibidores de serina/treonina quinasas (por ejemplo, inhibidores de señalización de Ras/RAF tales como inhibidores de la farnesilo transferasa, por ejemplo, sorafenib, tipifarnib y lonafarnib), inhibidores de la señalización celular a través de MEK y/o AKT quinasas, inhibidores de c-kit, inhibidores de quinasa abl, inhibidores de la quinasa Pl3, inhibidores de la quinasa Plt3, inhibidores de la quinasa CSF-1R, receptor de IGF, inhibidores de la quinasa; inhibidores de la aurora quinasa e inhibidores de quinasa dependiente de ciclina cuentos como inhibidores de CDK2 y/o CDK4; quinasas, inhibidores de c-kit, inhibidores de quinasa abl, inhibidores de la quinasa PI3, inhibidores de la quinasa PIt3, inhibidores de la quinasa CSF-1R, receptor de IGF, inhibidores de la guinasa; inhibidores de la aurora guinasa e inhibidores de quinasa dependiente de ciclina tales como inhibidores de CDK2 y/o CDK4;
- (v) agentes antiangiogénicos, como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento vascular endotelial, [por ejemplo, el anticuerpo anti-factor de crecimiento de células endoteliales vasculares bevacizumab (Avastin™); talidomida; lenalidomida; y, por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa del receptor de VEGF tal como vandetanib, vatalanib, sunitinib, axitinib y pazopanib;
- 40 (vi) enfoques de terapia génica, que incluye, por ejemplo, enfoques para reemplazar genes aberrantes tales como p53 aberrante o BRCA1 o BRCA2 aberrante;
- (vii) enfoques de inmunoterapia, incluidos, por ejemplo terapia de anticuerpos tales como alemtuzumab, rituximab, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) y ofatumumab; interferones tal como interferón a; interleucinas tal como IL-2
 (aldesleuquina); inhibidores de interleucina, por ejemplo, Inhibidores de IRAK4; vacunas contra el cáncer que incluyen vacunas profilácticas y de tratamiento cuentos como vacunas HPV, por ejemplo, Gardasil, Cervarix, Oncophage y Sipuleucel-T (Provenge); moduladores de receptores tipo toll, por ejemplo, agonistas de TLR-7 o TLR-9; y
 - (viii) agentes citotóxicos, por ejemplo, fludaribina (fludara), cladribina, pentostatina (Nipent™);
 - (ix) esteroides tales como corticosteroides, que incluyen glucocorticoides y mineralocorticoides, por ejemplo, aclometasona, dipropionato de alclometasona, aldosterona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, dipropionato de betametasona, fosfato sódico de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, clobetasona, butirato de clobetasona, propionato de clobetasol, cloprednol, cortisona, acetato de cortisona, cortivazol, deoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, isonicotinato de dexametasona, difluorocortolona, fluclorolona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortin butilo, fluorocortisona, fluorocortolona, caproato de fluocortolona, pivalato de fluocortolona, fluorometolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, flurandrenolona, fluticasona, propionato de fluticasona, halcinonida, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buprato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, icometasona, embutato de icometasona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona parametasona, furoato de mometasona monohidrato, prednicarbato, prednisolona, prednisona, tixocortol, pivalato de tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, alcohol triamcinolona y sus respectivos derivados farmacéuticamente aceptables. Se puede usar una combinación de esteroides, por ejemplo, una combinación de dos o más esteroides mencionados en este párrafo;

65

60

50

55

10

20

25

(x) terapias dirigidas, por ejemplo inhibidores de PI3Kd, por ejemplo idelalisib y perifosina; o compuestos que inhiben PD-1, PD-L1 y CAR T.

El uno o más de los otros agentes activos también pueden ser antibióticos (por ejemplo, antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorrubicina, daunomicina, epirrubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina).

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprenden" y "contienen" y las variaciones de las palabras significa "que incluyen pero sin limitarse a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos componentes, enteros o etapas. A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido en la descripción, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Los rasgos, números enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sea incompatible con estos. Todas las características descritas en esta descripción (que incluyen cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así descrito, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no se restringe a los detalles de ninguna modalidad anterior. La invención se extiende a cualquier característica nueva, o cualquier combinación nueva de las características descritas en esta descripción (incluyendo cualquier reivindicación, resumen y dibujos adjuntos), o a cualquier característica nueva o cualquier combinación nueva, de las etapas de cualquier método o proceso así revelado.

Ejemplo 1: Diastereoisómeros individuales de NUC-1031

Los isómeros (R) y (S) se pueden separar por HPLC en las siguientes condiciones:

Equipo: Serie Agilent 1200 ™ con detector DAD

Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

30 Columna: Chiralpak AD ™; 250 x 4,6 mm ID (fase normal)

Temperatura ambiente: Tamaño de partícula: 20 µm Alimento: disuelto en MeOH; 10 g/L

Disolvente: n-heptano/IPA 10 ->50% de alcohol isopropílico

El cromatograma se muestra en la Figura 1. El (S)-epímero eluyó a 8,6 min y el (R)-epímero eluyó a 10,3 minutos.

Métodos de caracterización y materiales: Los espectros de RMN de protón (¹H), carbono (¹³C), fósforo(³¹P) y flúor (¹9 F) fueron registrado en un espectrómetro Bruker Avance 500 a 25 °C. Los espectros se autocalibraron al pico de disolvente deuterado y todas las ¹³C NMR y ³¹ P NMR se desacoplaron con protones. La pureza de los compuestos finales se puede verificar mediante análisis por HPLC utilizando Varian Polaris C18-A (10 μM) como una columna analítica con un gradiente de elución de H₂O/MeOH de 100/0 a 0/100 en 35 min. El análisis de HPLC fue realizado por Varian Prostar (detector de LC Workstation-Varian prostar 335 LC).

45 2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O- [fenil(benciloxi-L-alaninil)]-(S)-fosfato 3

(ES+) m/z, encontró: (M + Na⁺) 603,14. C₂₅H₂₇F₂norte₄O₈NaP requerido: (M⁺) 580,47. ³¹P NMR (202 MHz, MeOD): δ_P 3,66

 $^{1}H \ RMN \ (500 \ MHz, \ MeOD): \ \delta_{H} \ 7,58 \ (d, \ J=7,5 \ Hz, \ 1H, \ H-6), \ 7,38 \ -7,32 \ (m, \ 7H, \ ArH), \ 7,26 \ -7,20 \ (m, \ 3H, \ ArH), \ 6,24 \ (t, \ J=7,5 \ Hz, \ 1H, \ H-1'), \ 5,84 \ (d, \ J=7,5 \ Hz, \ 1H, \ H-5), \ 5,20 \ (sistema \ AB, \ J_{AB} = 12,0 \ Hz, \ 2H, \ OCH_{2}Ph), \ 4,46 \ -4,43 \ (m, \ 1H, \ H-5'), \ 4,36 \ -4,31 \ (m, \ 1H, \ H-5'), \ 4,25 \ -4,19 \ (m, \ 1H, \ H-3'), \ 4,07 \ -4,00 \ (m, \ 2H, \ H-4', \ CHCH_{3}), \ 1,38 \ (d, \ J=7,2 \ Hz, \ 3H, \ CHCH_{3}). \ 1^{9}F \ NMR \ (470 \ MHz, \ MeOD): \ \delta_{F} \ -118,0 \ (d, \ J=241 \ Hz, \ F), \ -120,24 \ (ancho \ d, \ J=241 \ Hz, \ F). \$

 ^{13}RMN C (125 MHz, MeOD): δ_{C} 174,61 (d, $^{3}J_{\text{CP}}$ = 5,0 Hz, *C*= O, éster), 167,63 (*C*-NUEVA HAMPSHIRE₂), 157,74 (*C*= O base), 152,10 (d, $^{2}J_{\text{CP}}$ = 7,0 Hz, *C*-Ar), 142,40 (*C*Base H), 137,22 (*C*-Ar), 130,90, 129,63, 129,39, 129,32, 126,32 (*C*H-Ar), 124,51 (d, $^{1}J_{\text{CF}}$ = 257 Hz, *C*F₂), 121,47, 121,43 (*C*H-Ar), 96,67 (*C*H-base), 85,92 (señal amplia, *C*-1 '), 80,31 (*C*-4 '), 71,27

55 124,51 (d, ${}^{1}J_{CF}$ = 257 Hz, CF_{2}), 121,47, 121,43 (CH-Ar), 96,67 (CH-base), 85,92 (señal amplia, C-1 '), 80,31 (C-4 '), 71,27 (t aparente, ${}^{2}J_{CF}$ = 23,7 Hz, C-3 '), 68,03 (OCH₂pH), 65,73 (d, ${}^{2}J_{CP}$ = 5,30 Hz, C-5 '), 51,66 (CHCH₃), 20,42 (d, ${}^{3}J_{CP}$ = 6,25 Hz, CHCH₃).

HPLC inversa, eluyendo con $H_2O/MeOH$ de 100/0 a 0/100 en 35 minutos, mostró un pico de diastereoisómero con t_R = 22,53 min.

2'-desoxi-2', 2'-difluoro-D-citidina-5'-O- [fenilo (benciloxi-L-alaninil)]-(R)-fosfato 4.

(ES+) m/z, encontró: (M + Na⁺) 603,14. $C_{25}H_{27}F_2$ norte $_4O_8$ NaP requerido: (M⁺) 580,47. ^{31}P NMR (202 MHz, MeOD): δ_P 3,83

65

60

5

10

25

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ_H 7,56 (d, J = 7,5 Hz, 1H, H-6), 7,38 - 7,31 (m, 7H, ArH), 7,23 - 7,19 (m, 3H, ArH), 6,26 (t, J= 7,5 Hz, 1H, H-1'), 5,88 (d, J = 7,5 Hz, 1H, H-5), 5,20 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,49-4,46 (m, 1H, H-5'), 4,38 - 4,34 (m, 1H, H-5'), 4,23 - 4,17 (m, 1H, H-3'), 4,07 - 4,01 (m, 2H, H-4', CHCH₃), 1,38 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CHCH₃).

¹⁹F NMR (470 MHz, MeOD): $δ_F$ - 118,3 (d, J = 241 Hz, F), - 120,38 (ancho d, J = 241 Hz, F). ¹³RMN C (125 MHz, MeOD): $δ_C$ 174,65 (d, $^3J_{C-P}$ = 5,0 Hz, C= O, éster), 167,65 (C-NH₂), 157,75 (C= O base), 152,10 (d, $^2J_{CP}$ = 7,0 Hz, C-Ar), 142,28 (CBase H), 137,50 (C-Ar), 130,86, 129,63, 129,40, 129,32, 126,31 (CH-Ar), 124,50 (d, $^1J_{C-F}$ = 257 Hz, CF₂), 121,44, 121,40 (CH-Ar), 96,67 (CH-base), 85,90 (señal amplia, C-1'), 80,27 (C-4'), 71,30 (t aparente, ²J_C- $_{\rm F}$ = 23,7 Hz, C-3 '), 68,02 (OCH₂Ph), 65,50 (C-5 '), 51,83 (CHCH₃), 20,22 (d, $^{3}J_{\rm C-P}$ = 7,5 Hz, CHCH₃).

HPLC inversa, eluyendo con $H_2O/MeOH$ de 100/0 a 0/100 en 35 minutos, mostró un pico de diastereoisómero con t_R = 21.87 min.

Ejemplo 2: estudio de combinación de NUC-1031 y cisplatino in vitro.

2.1 Materiales v Métodos

10

15

35

Cultivos celulares y reactivos

A2780, SK-OV-3, OVCAR-3, NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H2122, 5637 v HT1376 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen-22400105) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; Invitrogen- 10099141). Todas las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con 5% de CO₂. Los medios de cultivo celular y los 20 suplementos se compraron de Invitrogen, y los matraces de cultivo de tejidos se compraron de Corning, las placas de 96 pocillos y las placas de 384 pocillos se compraron de Greiner. Los kits CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay se adquirieron de Promega (Promega-G7573), el contador de células Vi-Cell se adquirió de Beckman, el instrumento de detección Envision se adquirió de PerkinElmer. 25

Paclitaxcel (usado como referencia) y cisplatino se compraron de SELLECK, y tenían la mayor pureza disponible. Todos los compuestos alcanzaron solubilidad en DMSO y cuando se diluyeron en medios de cultivo. DMSO, soluciones de compuestos y medios de cultivo se calentaron a 37 ° C para la preparación de la solución y las diluciones.

Ensayo de citotoxicidad 30

Se permitió que ocho líneas celulares se adhirieran a placas de 96 pocillos durante la noche (100 µl/pocillo), para tratamientos farmacológicos con dilución de 3.16 veces. 9 puntos de dosis, triplicados o control del vehículo, se prepararon soluciones madre compuestas en DMSO y se añadieron a los pocillos para dar las concentraciones finales indicadas del fármaco. La concentración final de DMSO fue 0,5%. Las concentraciones de ATP celular se evaluaron usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo según las instrucciones del fabricante 72 h después de la adición del fármaco.

Análisis combinados

40 Se permitió que 8 líneas celulares se adhirieran a placas de 384 pocillos durante la noche (60 µl/pocillo), para el estudio de combinación, se investigarán cuatro combinaciones de dos compuestos dos veces, manteniendo un compuesto a una concentración fija y aumentando la concentración del segundo compuesto (10 veces dilución, 5 puntos de dosis), las soluciones madre compuestas se prepararon en DMSO y se añadieron a los pocillos para dar las concentraciones finales indicadas del fármaco mediante el dispensador digital D300e. La concentración final de DMSO fue 0,5%. 45

Las concentraciones de ATP celular se evaluaron usando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo según las instrucciones del fabricante 72 horas después de la adición del fármaco.

Por lo tanto, el estudio consta de dos etapas:

Etapa 1: Determinación de agente individual IC50

En la etapa 1, la Cl₅₀ (usando 5 o más concentraciones) de cada compuesto individual (cisplatino, gemcitabina y NUC-1031) en las líneas celulares relevantes se determinó.

Tabla 1: La concentración máxima de los agentes individuales en serie se diluyó en 3,16 veces en 9 puntos y se probó por triplicado.

Concentración máxima	a (uM)			
Nombre de la celda	Cisplatino	Gemcitabina	NUC-1031	Paclitaxcel
A2780	198	1,98	1,98	1,98
SK-OV-3	198	1,98	1,98	1,98
OVCAR-3	198	1,98	1,98	1,98

65

60

50

5

NCI-H460	198	1,98	1,98	1,98
NCI-H1975	198	1,98	1,98	1,98
5673	198	1,98	1,98	1,98
HT1376	198	1,98	1,98	1,98

10 <u>Etapa 2: Tratamientos de combinación</u>

La etapa 2 determinó la interacción de combinaciones seleccionadas de compuestos en el crecimiento de células cancerosas. En total se probaron 8 condiciones en las líneas celulares relevantes. Esto significa que cuatro combinaciones de dos compuestos se investigaron dos veces, manteniendo un compuesto a una concentración fija mientras se aumenta la concentración del segundo compuesto.

A2780

SK-OV3

OVCAR-3

NCI-460

NCI-1975

5637

al HT-1376

NUC-1031

cisplatino

Χ

Χ

Χ

Χ

Χ

Х

+

Gemcitabina +

cisplatino

X X

Х

Χ

Χ

Χ

Χ

Tabla 2: Plan de tratamientos combinados realizado por cuadruplicado, 5 puntos con dilución 10 veces.

de Características de la línea celular Línea celular

moderada

Línea sensible al platino

Línea sensible al platino

Sensible al cisplatino.

Sensibilidad

cisplatino.

Sensibilidad moderada al platino

Sensibilidad moderada al platino

Resistencia moderada al cisplatino.

2	()	

15

25

20

30

2.2 Métodos analíticos

Tipo

tumor

Ovario

Ovario

Ovario

NSCLC

NSCLC

Vejiga

Vejiga

35

40

45

65

Se utilizará la siguiente terminología para caracterizar el efecto de las combinaciones de compuestos:

- "Sinergia" tal como se define por: mayor efecto observado de los compuestos combinados que el predicho a partir de los efectos de compuestos individuales.
- Efecto "aditivo" como se define por: el efecto observado de los compuestos combinados es igual al predicho a partir de la suma de los efectos de los compuestos individuales.
- "Antagonismo" como se define por: efecto significativamente más débil de los compuestos combinados que lo predicho
 a partir de los efectos de compuestos individuales.

Método Chou-Talalay

El método de Chou-Talalay para la combinación de drogas se basa en la ecuación de efecto medio, derivada del principio de la ley de acción de masas, el teorema del índice de combinación resultante (IC) de Chou-Talalay ofrece una definición cuantitativa para el efecto aditivo (CI = 1), sinergia (CI<1) en combinaciones de drogas.

Modelo de independencia de la dicha

El método compara la respuesta combinada observada (YO) con la respuesta combinada pronosticada (YP), que se obtuvo basándose en el supuesto de que las interacciones farmacológicas no tienen ningún efecto.

Supongamos que dos fármacos, A y B, inhiben el crecimiento tumoral: el fármaco A a la dosis a inhibe el porcentaje de crecimiento tumoral Y y el fármaco B a la dosis b inhibe el porcentaje de crecimiento tumoral Y Si dos medicamentos funcionan de forma independiente, el porcentaje combinado de inhibición

60 Yab, P puede predecirse usando la aditividad completa de la teoría de probabilidad como Yab P = Yun + Ysi-YunYsi

Análisis de cambio de curva

Suponga que dos medicamentos funcionan de manera independiente, mantenga el medicamento A en una concentración fija y varíe la concentración del medicamento B, normalice el efecto combinado basado en la concentración fija de A,

compare las curvas de efecto de dosis obtenidas del medicamento B, un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de combinación de dosis y efecto en relación con la sinergia, un desplazamiento hacia la derecha indica antagonismo, y la superposición indica aditivo.

5 2.3 Resultados

Etapa 1: ensayo de citotoxicidad con agentes individuales.

En la Etapa 1 del estudio, se ha investigado la citotoxicidad de los agentes individuales cisplatino, NUC-1031 y gemcitabina para informar las concentraciones más apropiadas para el trabajo de combinación en la Etapa 2.

Tabla 3: Resumen de IC 50 absoluto, IC 50 relativo y resultados de inhibición máximos para el tratamiento con agentes únicos en las líneas celulares de cáncer relevantes analizadas.

Tabla 3: Resumen de IC 50 absoluto, IC 50 relativo y resultados de inhibición máximos para el tratamiento con agentes únicos en las líneas celulares de cáncer relevantes analizadas.

vantes analizadas.	izadas.									
Numero Línea	Línea	Ensayo CTG	(D							
	celular	Cisplatino			Gemcitabina			NUC-1031		
		Ab IC50 (uM)	IC50 IC50 (uM)	Inhibición máxima_%	Ab IC50 IC50 (uM)	IC50 (uM)	Inhibición máxima_%	Ab IC50 (uM)	IC50 (uM)	Inhibición máxima_%
_	A2780	10,96	10,07	99,05	0,01	0,01	81,15	0,025	0,016	79,15
2	SK-OV3	45,61	33,73	86,42	0,02	0,02	65,74		90,0	61,59
3	OVCAR-3	28,32	23,46	79,59	>1,98	0,02	6,95	>1,98	0,20	11,76
4	NCI-H460	2,59	2,57	97,56	0,01	0,01	96,28	0,04	0,04	91,98
5	NCI-H1975 69,55	69,55	69,23	103,60	0,08	0,02	62,12	>1,98	0,37	37,91
9	5637	13,70	13,21	101,74	0,01	0,01	84,49	0,20	0,12	77,88
7	HT1376	20,51	18,36	71,90	>1,98	>1,98	09'6	>1,98	>1,98	-2,54

Resumen de datos - Resumen de resultados de los tres métodos analíticos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

La Tabla 4 a continuación muestra el resultado del análisis utilizando las 3 metodologías (Chou-Talalay, Bliss Independence y Curve Shift) para caracterizar el efecto de los compuestos combinados NUC-1031 y cisplatino.

Tabla 4: Resultado de las 3 metodologías analíticas utilizadas para evaluar el efecto de los compuestos combinados sobre el crecimiento de células cancerosas

	Concentracion	Metodología			
Línea celular	Fija	Chou-Talalay	Dicha independencia	Cambio de curva	
A2780	Acelarina 0,025uM	Aditivo	Aditivo	Aditivo	
(Ovario)	Cisplatino 11uM				
SK-OV3	Acelarina 0,072uM	Inconmensurable	Aditivo	Aditivo	
(Ovario)	Cisplatino 45,6uM	inconnensurable	Aditivo	Aditivo	
OVCAR-3	Acelarina 1,98uM	Inconmensurable	Aditivo	Aditivo	
(Ovario)	Cisplatino 28,3uM	incommensurable	Aditivo	Aditivo	
NCI-H460	celarina 0,04uM		Antagonismo		
(Pulmón)	Cisplatino 2,6uM	Antagonismo	Cisplatino 2,6uM + Acelarina 0,0198uM	Aditivo	
NCI-H1975 (Pulmón)	Acelarina 1,98uM	Aditivo	Aditivo	Aditivo	
(Fullfloff)	Cisplatino 70uM				
E627 (voiigo)	Acelarina 0,199uM	SINERGIA	Aditivo	Antaganiama	
5637 (vejiga)	Cisplatino 13,7uM	SINERGIA	Aditivo	Antagonismo	
HT-1376	Acelarina 1,98uM	SINERGIA	SINERGIA	SINERGIA	
(vejiga)	Cisplatino 20,51uM	SINERGIA	SINERGIA	SINERGIA	

La concordancia de los resultados entre los tres métodos analíticos mostró que se observó sinergia con dos combinaciones de compuestos contra la línea celular de cáncer HT1376 y esto se ha resumido en la tabla 5.

Tabla 5: Sinergia de los tratamientos combinados observados en los tres métodos

Línea celular	Concentración Fija	Dosis-efecto en serie
HT1376 (vejiga)	Gemcitabina 1,98µM	Cisplatino
HT1376 (vejiga)	NUC-1031 1,98µM	Cisplatino

Resultados metodológicos individuales

60 Datos analizados utilizando el método Chou-Talalay

CI <1, lo que sugiere sinergia

Datos de CI pa	ara combo no constante:	GemCis (Cis + 0	Gema)	
Dosis Cis	Gema de dosis	Efecto	CI	Línea celular
198,0	0,007	0,8952	0,518	A2780
11,0	1,98	0,8525	0,528	A2780
11,0	0,198	0,7973	0,489	A2780
198,0	0,008	0,931	0,341	NCI-H460
19,8	0,008	0,7922	0,375	NCI-H460
198,0	0,08	0,7688	0,15028	NCI-H1975
19,8	0,08	0,6851	0,17708	NCI-H1975
1,98	0,08	0,6976	0,149	NCI-H1975
70,0	0,198	0,7231	0,33835	NCI-H1975
70,0	0,0198	0,4228	0,65284	NCI-H1975
19,8	0,012	0,7909	0,68758	5637
1,98	0,012	0,7836	0,20073	5637
0,198	0,012	0,7522	0,19804	5637
0,0198	0,012	0,7314	0,22947	5637
13,7	0,198	0,9446	0,31724	5637
13,7	0,0198	0,8726	0,33306	5637
198,0	1,98	0,7601	0,46232	HT1376
19,8	1,98	0,6007	0,59809	HT1376
20,51	1,98	0,6572	0,4459	HT1376
20,51	0,198	0,5269	0,3652	HT1376
Datos de CI pa	ara combo no constante:	AceCis (Cis + A	ice)	
Dosis Cis	Dosis Ace	Efecto	CI	Línea celular
198,0	0,025	0,9004	0,505	A2780
11,0	0,198	0,6605	0,642	A2780
2,6	0,198	0,7749	0,595	NCI-H460
198,0	1,98	0,8097	0,27205	NCI-H1975
70,0	0,198	0,5335	0,65375	NCI-H1975
198,0	0,199	0,9794	0,57158	5637
1,98	0,199	0,8218	0,60206	5637
0,198	0,199	0,7971	0,69873	5637
0,0198	0,199	0,8019	0,66363	5637
13,7	0,198	0,8715	0,56581	5637
19,8	1,98	0,4966	0,27588	HT1376
20,51	1,98	0,6016	0,22343	HT1376
20,51	0,198	0,3899	0,36726	HT1376
20,51	0,0198	0,274	0,49796	HT1376
20,51	0,00198	0,2662	0,50941	HT1376
20,51	1,98E-4	0,3175	0,44121	HT1376

CI> 1, lo que sugiere antagonismo

Datos de CI para combo no constante: GemCis (Cis + Gema)					
Dosis Cis	Gema de dosis	Efecto	CI	Línea celular	
19,8	0,007	0,519	18,3616	A2780	
1,98	0,007	0,3904	302,897	A2780	
Datos de CI pa	Datos de CI para combo no constante: AceCis (Cis + Ace)				
Dosis Cis	Dosis Ace	Efecto	CI	Línea celular	
11,0	J,00198	0,3049	2,22423	A2780	
1,98	0,04	0,3557	2,266	NCI-H460	
0,198	0,04	0,2166	4,306	NCI-H460	
2,6	0,0198	0,1942	6,145	NCI-H460	
2,6	0,00198	0,2357	2,665	NCI-H460	

Datos analizados utilizando el método de cambio de curva

El efecto de sinergia que se muestra a continuación en la línea celular de cáncer de vejiga HT1376 se muestra en la figura 2.

	Gem (1,98µM)+Cisplatino	Cisplatino	Acelarina (1,98µM)+Cisplatino	Cisplatino 2
IC50	30,30	64,45	36,27	57,98

Datos analizados utilizando el método de Bliss Independence

Línea celular	Concentración Fija	Dosis-efecto en serie
SINERGIA		
HT1376	Gemcitabina 1,98uM	Cisplatino
HT1376	Cisplatino 20,51 uM	Gemcitabina
HT1376	NUC-1031 1,98uM	Cisplatino
HT1376	Cisplatino 20,51uM	NUC-1031

EJEMPLO 3: combinación adicional de NUC-1031 y estudio in vitro de cisplatino

Cultivo celular y reactivos

Las células SKOV3 se compraron de American Type Culture Collection (ATCC). Se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ en Gibco™ RMPI Medium 1640 + GlutaMAX™ -I (Life Technologies; 61870-010) con 10% Gibco™ FBS (Life Technologies; 10270-106) y 1% Gibco™ Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies; 15140122), conocido como medio completo, en un matraz de cultivo celular. El cisplatino se adquirió de TEVA UK Limited (PL 00289/1146). La fluvastatina y el sulforafano se compraron a Merck Millipore Corporation (números de catálogo 344096 y 574215, respectivamente). (S)-NUC-1031 fue proporcionado por NuCana® Ltd.

55 Cultivo celular con aplicaciones de drogas

Las células SKOV3 se sembraron en placas a 250 células en 200 µl por pocillo en los 60 pocillos centrales de placas Costar® 3596 de 96 pocillos, con los 36 pocillos externos llenos con 200 µl de PBS cada uno. Se permitió que las células crecieran en medio completo durante 48 horas antes de que se añadieran diferentes compuestos farmacológicos. Para el agente único, se agregaron cisplatino, (S)-NUC-1031, fluvastatina y sulforafano en medio completo a 10 concentraciones diferentes en los 60 pocillos intermedios (Día 0). Cada concentración se cargó en sextuplicado. Las células se expusieron a los compuestos durante 24 horas y los compuestos se reemplazaron por medio completo puro. El experimento con fluvastatina se repitió con una exposición de 4 días en lugar de 24 horas. Las placas se fijaron con 50 µl de solución de TCA al 25% a 4 °C durante 60 minutos el día 4 después de que se añadieron los compuestos del fármaco para el ensayo de Sulforhodamine B (ver a continuación).

22

5

10

20

15

25

30

35

40

45

50

60

Para la combinación de dos agentes, las diferentes concentraciones de cisplatino y fluvastatina, y dos concentraciones fijas de cisplatino combinadas con diversas concentraciones de fluvastatina se colocaron en placas en una placa Costar® 3596 de 96 pocillos por triplicado en los 60 pocillos centrales. Los 36 pocillos exteriores se llenaron con 200 µl de PBS cada uno (Día 0). Se permitió la exposición de las células durante 24 horas a los compuestos del fármaco, y los compuestos se aspiraron y reemplazaron con medio completo puro el día 1. El experimento se repitió con cisplatino con sulforafano y cisplatino con (S)-NUC-1031, y cada concentración también se cargó por triplicado. Las placas se fijaron con 50 µl de solución de TCA al 25% a 4 °C durante 60 minutos el día 4 para el ensayo de Sulforhodamine B (ver a continuación).

10 Ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB)

Después de agregar la solución de TCA, las placas se lavaron con agua corriente 10 veces y se dejaron secar en el horno a 50 °C. Luego, las células se tiñeron con 50 µl de colorante SRB, y el colorante se lavó con ácido acético glacial al 1% durante 4 veces 30 minutos después de la adición de SRB. Las placas se secaron luego en el horno. Se dejó que el colorante SRB se disolviera en 150 µl de solución tampón Tris 10 mM durante 60 minutos en un balancín. Las placas se leyeron en el lector de microplacas Biohit BP800 (Biohit Healthcare) y la absorbancia se midió a 540 nm. Los resultados de los experimentos de agente único y combinación se usaron para calcular IC50 de los compuestos farmacológicos utilizando Prism Software (GraphPad), que es la concentración del fármaco que causa un 50% de inhibición. En cuanto a los resultados de la combinación de dos agentes, se usaron para calcular el índice de combinación (CI) de los compuestos usando el software CalcuSyn (Biosoft).

Resultados:

15

20

35

45

50

65

La CI50 de cisplatino y sulforafano fue 2,436 μM y 7,002 μM respectivamente. IC50, de fluvastatina y NUC-1031 no se pudo calcular debido a los efectos inhibitorios no observables. Los valores de CI de cisplatino con fluvastatina variaron de 0,355 a 0,557, mostrando sinergia. Los valores de CI de cisplatino con sulforafano variaron de 0,891 a 1,474, mostrando antagonismo. Los valores de CI de cisplatino con NUC-1031 a 0,1 - 0,5 μM y 1 - 2 μM en las células SKOV3 varían de 0,871 a 0,957, y 1,067 a 1,756 respectivamente.

30 Conclusión

Se encontró inhibición sinérgica a bajas concentraciones de NUC-1031 (0,1 - 0,5 μM) con cisplatino en las células SKOV3, lo que hace que sea más probable que se use clínicamente, ya que las concentraciones más bajas de medicamentos generalmente dan una toxicidad más baja. Este resultado puede actuar como base para una mayor investigación sobre la dosis de combinación óptima precisa antes de la prueba en pacientes para garantizar la eficacia y la seguridad. El tratamiento personalizado mediante la evaluación de la citotoxicidad y los efectos secundarios de la combinación en individuos sería óptimo debido a la diversidad del perfil genético y la respuesta a los medicamentos, de modo que cada paciente pueda recibir medicamentos a las dosis óptimas.

40 EJEMPLO 4 - Análisis farmacocinético de las concentraciones de dFdCTP del estudio clínico ABC-008 (NUC-1031 en combinación con cisplatino) y comparación con los resultados del estudio clínico ProGem1 (NUC-1031 solo).

El análisis farmacocinético inicial se realizó en muestras obtenidas de los primeros tres pacientes en el estudio clínico ABC-008.

Los detalles del paciente son los siguientes:

Paciente 1: 71 años - Carcinoma del tracto biliar metastásico - Dosis inicial: 625mg/m² (S)-NUC-1031 + 25 mg/m² cisplatino Paciente 2: 78 años - Carcinoma del tracto biliar metastásico - Dosis inicial: 625mg/m² (S)-NUC-1031 + 25 mg/m² cisplatino Paciente 3: 75 años - Carcinoma del tracto biliar metastásico - Dosis inicial: 625mg/m² (S)-NUC-1031 + 25 mg/m² cisplatino

Tanto NUC-1031 como cisplatino se administraron los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días.

Una dosis adecuada de 625 mg/m² de NUC-1031 se preparó en una jeringa de Luerlock. La dosis administrada se basó en la altura y el peso del sujeto utilizando un cálculo estándar del área de superficie corporal (BSA). Se preparó una línea de extensión de polietileno con hasta 1,5 ml de solución de lavado, antes de conectar la jeringa que contiene NUC-1031 a la línea de extensión.

La línea de extensión se conectó al dispositivo de acceso venoso central (CVAD) del paciente y se inyectó NUC-1031 a una velocidad de 20 ml/hora usando una bomba de jeringa.

Una vez que se completó la inyección, la jeringa NUC-1031 se desconectó de la línea de extensión, y la línea de extensión se lavó con un volumen adicional de hasta 3 ml de solución de lavado.

Materiales y métodos

1. Materiales

El compuesto de referencia dFdCTP se obtuvo de Biorbyt, Reino Unido. Lymphoprep de STEMCELL Technologies Inc., Reino Unido. El ácido perclórico (PCA), el acetato de amonio (NH4Ac) y el amoníaco se obtuvieron de Sigma Aldrich, Reino Unido. El agua de grado LC-MS, metanol, acetonitrilo y ácido fórmico se obtuvieron de Fisher Scientific, Reino Unido

2. Métodos

5

20

35

40

45

50

55

A. Recolección de sangre y preparación de PBMC: Se recogieron 6 ml de sangre usando tubos de recogida de sangre heparinizados. Después de la centrifugación y la separación del plasma, se recogió el buffycoat y se transfirió a un nuevo tubo de ensayo que contenía 3 ml de gradiente de densidad de Lymphoprep. Después de la centrifugación, la interfaz superior que contiene la capa de PBMC se transfirió a un nuevo tubo de ensayo. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las PBMC se resuspendieron en 100 µl de PBS. Luego, se agregaron otros 100 µl de PCA 0,8 M y la mezcla se mezcló en vórtex y se centrifugó seguido de la transferencia de 100 µl de sobrenadante a un nuevo tubo de ensayo. Los extractos de PCA se almacenaron a -80 ° C hasta el momento del análisis.

B. Extracción de muestra (PBMC): Los extractos de PCA se tamponaron usando 50 μl de NH₄Ac 1M, luego se neutraliza usando 20 μl de solución de amoniaco al 10%. Finalmente, se añadieron 5 μl que contenían el patrón interno 8-ChloroATP y 5 μl de agua desionizada. Los extractos se transfirieron a viales LC-MS y se inyectaron 10 μl en el sistema UPLC-MS/MS.

3. Método de cromatografía y análisis de muestras.

Se preparó una solución madre de 10 mg/ml del analito y alícuotas congeladas a -80 ° C hasta su uso. El analito se resolvió utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (Accela UPLC, Thermo Scientific, Reino Unido) equipado con una columna Biobasic AX, 5 μm, 50×2,1 mm (Thermo Electron Corporation, Murrieta, CA, EE. UU.) y una fase móvil que consiste en una mezcla de 10 mM NH₄Ac en ACN/H₂O (30:70 v/v), pH 6,0 (A) y NH₄Ac 1 mM en ACN/H₂O (30:70 v/v), pH 10,5 (B). Se empleó el gradiente de fase móvil, que comprende: tampón A = 95% a 0 – 0,5 min, de 95 a 0% durante 1,25 minutos, mantenido a 0% durante 1,75 minutos, de 0 a 95% durante 0,1 minutos, terminando con 95% durante 2,9 minutos, todo a un caudal de 500 μl/min.

4. Método de espectrometría de masas

Los compuestos de interés de elución se detectaron utilizando un sistema de espectrometría de masas Vantage de triple cuadrupolo (Thermo Scientific, Reino Unido) equipado con una fuente de iones de electrospray. Las muestras se analizaron en los modos de monitoreo de reacción múltiple (MRM), modo de iones positivo (+ ve) y negativo (-ve) a un voltaje de pulverización de 3500 y 3000 V, respectivamente. El nitrógeno se utilizó como gases de revestimiento y auxiliares a un caudal de 50 y 20 unidades arbitrarias, respectivamente. Se utilizó argón como gas de colisión con una presión de 1,5 mTorr.

Resultados

Los resultados se presentan en las Tablas 9 y 10.

Tabla 10: Comparación de los parámetros PK medios de los estudios ProGem1 y ABC-008

Parámetros medios	Parámetros medios de PK en plasma (sin normalización) para NUC-1031				
	ProGem1 (n=67) (NUC-1031 como agente único)	ABC-008 (n=3) (NUC-1031 en combinación con cisplatino)			
Media C _{max} (μg/ml)	66,5	124,6			
T mediana _{max} (h)	0,5	0,5			
AUC medio ₀₋₂₄ (µg/ml.h)	66,5	142,8			
T terminal medio _{1/2} (h)	0,9	0,5			
Liquidación media (L/h)	5,2	8,3			

60

٦

Tabla 10: Comparación de los parámetros PK medios de los estudios ProGem1 y ABC-008

Parámetros medios de PK	ntracelular (sin normalización) ¡	oara dFdCTP
	ProGem1 (n=67) (NUC-1031 como agente único)	ABC-008 (n=3) (NUC-1031 en combinación con cisplatino)
Media C _{max} (pmol/millón de células)	391,8	350,4
T mediana _{max} (h)	0,5	1
AUC medio ₀₋₂₄ (pmol/millón de células.h)	1379,0	1130,0
T terminal medio _{1/2} (h)	5,7	20,6
Liquidación media (L/h)	0,2	0,3

Discusión

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Los parámetros de PK en plasma de NUC-1031 mostraron un aumento de 2,1 veces en el AUC y un aumento de 1,9 veces en la Cmáx en comparación con ProGem1 (el primer estudio en fase I en humanos con el agente único NUc-1031). Los parámetros de PK en plasma de NUC-1031 también mostraron un aumento de 3,6 veces en la vida media en comparación con el agente único NUC-1031.

Los parámetros intracelulares de dFdCTP (el resto anticancerígeno activo) fueron muy similares a ProGem1 con la notable excepción de t1/2 más largo. Este t1/2 más largo puede deberse a niveles más altos mantenidos de dFdCTP intracelular durante el período de 4 horas de muestreo de PK. La sinergia observada en los niveles de dFdCTP después de NUC-1031 con el tratamiento con cisplatino tiene implicaciones clínicas potenciales significativas, incluida una utilidad clínica más amplia para tratar cánceres donde se requieren altos niveles de dFdCTP durante un período de tiempo más largo para bloquear el crecimiento tumoral y en el tratamiento de cánceres recurrentes después de un solo agente utilizar.

Se apreciará que la vida media aumentada de dFdCTP observada en el tratamiento usando las combinaciones de gemcitabina-[fenil-benzoxil-L-alaninil]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, con los agentes anticancerígenos basados en platimum descritos en el presente documento, proporciona ventajas en el tratamiento del cáncer en varios contextos. Se encuentra una gran ventaja en la flexibilidad de dosificación que confiere este aumento de la vida media. Por ejemplo, tales usos médicos permiten regímenes de tratamiento efectivos en los que la incidencia del tratamiento con los agentes activos es menos frecuente que los empleados actualmente. Simplemente a modo de ejemplo, los tratamientos de la invención se pueden proporcionar a un paciente en una sola incidencia diaria de tratamiento, en lugar de requerir múltiples administraciones a lo largo del día. Las incidencias de tratamiento adecuadas, por ejemplo, tales incidencias únicas de tratamiento, pueden requerir una provisión relativamente rápida de los agentes activos, en lugar de una administración prolongada, por ejemplo, mediante infusión. La gemcitabina-[fenil-benzoxil-L-alaninil]-fosfato y el agente anticancerígeno a base de platino con el que se va a usar se pueden formular (en combinación o individualmente) como un medicamento para la administración diaria única a un paciente. Los medicamentos de este tipo, para administración diaria única, pueden ser útiles en el tratamiento de cánceres recurrentes.

Tratamientos de acuerdo con la invención, utilizando gemcitabina-[fenil-benzoxil-L-alaninil]-fosfato en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino, ya sea en combinación o de forma secuencial, puede usarse en casos de tratamiento proporcionado cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, o todas las semanas. De hecho, los tratamientos de acuerdo con la invención pueden usarse en casos de tratamiento proporcionados una, dos o tres semanas de diferencia entre sí.

EJEMPLO 5 - Comparación de los puntos clave del tiempo de supervivencia libre de progresión obtenidos hasta la fecha en el estudio ABC-08 y las respuestas radiológicas asociadas, frente a los puntos de tiempo medios establecidos para la supervivencia libre de progresión en el estudio ABC-02 en la terapia combinada de Gemcitabina y Gemcitabina/Cisplatino de agente único .

Antecedente ABC-02:

El estudio ABC-02 estableció la combinación de gemcitabina/cisplatino como el tratamiento estándar de atención superior en comparación con la gemcitabina sola en el entorno biliar metastásico. La mediana establecida para la supervivencia libre de progresión para los pacientes que recibieron gemcitabina/cisplatino fue de 8 meses. La mediana establecida para la supervivencia libre de progresión para los pacientes que recibieron gemcitabina como terapia de agente único fue de 5 meses. (Valle J, Wasan H, Palmer DH et al en 2010)

Comparación ABC-08:

Los puntos de tiempo de supervivencia libre de progresión obtenidos hasta la fecha en el estudio ABC-08 han excedido la mediana establecida para la terapia combinada de Gemcitabina y Gemcitabina/Cisplatino como agente único. A continuación se citan casos específicos:

<u>Paciente 02:</u> - tuvo una reducción del 60% en la dosis de NUC-1031 a 375 mg/m² y una reducción acompañante del 25% en cisplatino. Sin embargo, como se detalla a continuación, ella procedió a exhibir una serie de reducciones sostenidas en el volumen del tumor.

Este paciente ha alcanzado un tiempo de supervivencia libre de progresión de 9 meses y está en curso. Este es el punto de tiempo de supervivencia libre de progresión más largo observado en el estudio ABC-08 y actualmente supera la mediana establecida por el estudio ABC-02.

Este mismo paciente ha demostrado reducciones continuas sostenidas en el volumen del tumor a través de múltiples evaluaciones radiológicas.

• Escaneo del mes 3: Reducción del 17% - Enfermedad estable

5

25

30

- Escaneo del mes 6: Reducción del 24% Enfermedad estable
- Escaneo del mes 9: Reducción del 41%: respuesta parcial.
- Paciente 05 55 años Carcinoma del tracto biliar metastásico Dosis inicial: 625mg/m² (S)-NUC-1031 + 25mg/m² cisplatino

Este paciente ha alcanzado un punto de tiempo de supervivencia libre de progresión de 5,5 meses y actualmente está en curso, superando el punto de tiempo de supervivencia libre de progresión medio de 5 meses establecido para pacientes que reciben un agente único Gemcitabina.

Este mismo paciente ha demostrado una reducción significativa en el volumen del tumor en la primera evaluación radiológica:

• Escaneo del mes 3: Reducción del 54% - Respuesta parcial.

Aunque estos resultados son de pacientes individuales, representan resultados clínicos prometedores para la combinación de la invención.

REIVINDICACIONES

- Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento del cáncer en combinación con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino.
 - 2. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para uso de la reivindicación 1, en donde el agente anticancerígeno basado en platino es cisplatino.
- 10 3. Gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato es gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninilo)]-(S)-fosfato en forma sustancialmente diastereoméricamente pura.
- 4. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato es una mezcla de diastereoisómeros de fosfato.
 - 5. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el fosfato de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)] está en forma de base libre.
- 6. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el fosfato de gemcitabina- [fenil-benzoxi-L-alaninil)] se administra por vía intravenosa.
- 7. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cáncer es un tumor sólido, por ejemplo, un cáncer seleccionado de cáncer de ovario, cáncer de vejiga y cáncer del tracto biliar.
 - 8. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para uso de la reivindicación 7, en donde el cáncer es cáncer de vías biliares, por ejemplo, un cáncer seleccionado de cáncer de vesícula biliar, cáncer de conducto biliar distal, cáncer de ampolla, colangiocarcinoma hiliar e intrahepático colangiocarcinoma.
 - 9. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cáncer recae.
- 10. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cáncer es metastásico.
 - 11. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el cáncer es refractario, resistente o parcialmente resistente al agente anticancerígeno a base de platino.
- 40 12. Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el cáncer es sensible al agente anticancerígeno a base de platino.
- Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la dosis de gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato administrado en cada evento de administración es entre 250 mg/m² y 1250 mg/m² y la dosis del agente anticancerígeno a base de platino administrado en cada evento de administración está entre 10 mg/m² y 200 mg/m².
- Un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado entre cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
 - 15. Una formulación farmacéutica que comprende Gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con un agente anticancerígeno a base de platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino, y al menos uno excipiente farmacéuticamente aceptable.
 - 16. Un kit que comprende dos formulaciones separadas para usarse juntas, siendo las formulaciones: una primera formulación que comprende gemcitabina-[fenil-benzoxi-L-alaninil)]-fosfato, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y una segunda formulación que comprende un agente anticancerígeno basado en platino seleccionado de cisplatino, picoplatino, lipoplatino y triplatino y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55

60

5

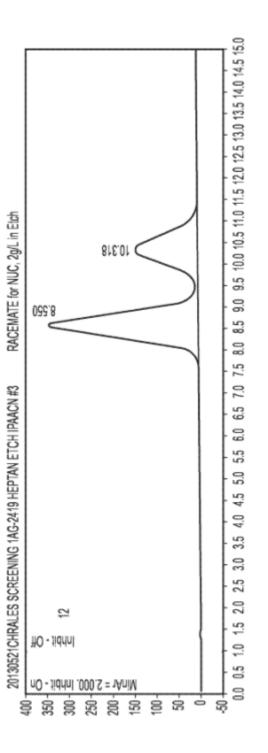


FIGURA 1

FIGURA 2

