



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 325 055**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/5513 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01920653 .1**

(96) Fecha de presentación : **22.03.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1272193**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

(54) Título: **Terapia de combinación sinérgica para el tratamiento del cáncer.**

(30) Prioridad: **27.03.2000 US 192278 P**

(73) Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company
Lawrenceville-Princeton Road, P.O. Box 4000
Princeton, New Jersey 08543-4000, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2009

(72) Inventor/es: **Lee, Francis, Y.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2009

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 325 055 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación sinérgica para el tratamiento del cáncer.

5 La presente invención se refiere a terapias para el tratamiento del cáncer, específicamente al uso sinérgico de dos o más agentes anti-cancerosos que tienen actividades antiproliferativas citotóxicas y citoestáticas.

10 La quimioterapia, la administración sistémica de agentes anti-neoplásicos que se desplazan a través del cuerpo por el sistema circulatorio sanguíneo, junto con y, a menudo conjuntamente con, cirugía y/o tratamiento por radiación, se ha usado ampliamente durante años en el tratamiento de una gran diversidad de cánceres. Desafortunadamente, los fármacos quimioterapéuticos disponibles a menudo malogran a los pacientes porque destruyen muchas células sanas y, de esta manera, producen efectos secundarios graves que limitan las dosis que pueden administrar los médicos.

15 En particular, los tumores cancerosos son difíciles de tratar porque contienen células cancerosas proliferativas y no proliferativas. A medida que crece un tumor canceroso, el desarrollo vascular a menudo no puede mantener el ritmo con la rápida proliferación de la población de células malignas. En consecuencia, las masas sólidas de tumor canceroso típicamente presentan redes anormales de vasos sanguíneos que, a diferencia de los vasos en tejidos normales, fallan a la hora de proporcionar un soporte nutricional adecuado a las células del tumor canceroso para un crecimiento óptimo.

20 En la mayoría de tumores cancerosos sólidos, las células tumorales no proliferativas constituyen la mayor parte de la población total de células tumorales. Además, a medida que un tumor aumenta de tamaño la proporción de células tumorales no proliferativas aumenta también en proporción. Como la mayoría de agentes anti-cancerosos actuales se dirigen a células proliferativas, la población de células tumorales no proliferativas se ha visto implicada como un factor contributivo principal en el fallo de la radiación o quimioterapia usadas en solitario o conjuntamente para curar una enfermedad neoplásica.

25 Como se ha mencionado anteriormente, a medida que un tumor aumenta de tamaño, típicamente se hace más refractario a la mayoría de quimioterapias. Por consiguiente, la mayoría de procedimientos de erradicación de tumores incluyen una etapa de apelmazado para reducir la masa del tumor antes de la administración de los agentes anti-neoplásicos. Sin embargo, el apelmazado no siempre da como resultado la erradicación del tumor, incluso cuando se combina con agentes quimioterapéuticos potentes. Por consiguiente, hay una necesidad en la técnica de nuevos tratamientos que se dirigen a células cancerosas, tanto proliferativas como no proliferativas, para el tratamiento de malignidades.

30 35 El documento WO 98/54966 desvela terapias combinadas que emplean un agente anti-neoplásico o terapia de radiación junto con un inhibidor de la proteína prenil-transferasa que puede ser útil en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el documento WO 98/54966 no describe el uso de los compuestos de fórmula I.

40 45 El documento U.S. 6.011.029 desvela los compuestos de fórmula I y proporciona procedimientos para su uso como agentes anti-cancerosos. Además, esta patente describe genéricamente que los compuestos de fórmula I pueden ser útiles junto con otras terapias para el cáncer. Sin embargo, el documento U.S. 6.011.029 no describe ningún tratamiento combinado específico ni describe o sugiere tratamientos combinados que actúan sinérgicamente como tratamientos anti-cáncer.

50 55 El documento WO 2000/42849 A1 se refiere a un complejo inhibidor de ras-farnesil-transferasa formado por un inhibidor de ras-farnesil-transferasa o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y sulfobutiléter-7-β-ciclodextrina o 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina. Se dice que los inhibidores de ras-farnesil-transferasa son útiles como agentes anti-tumorales.

50 El documento US 6.011.029 desvela compuestos de benzodiazepina que tienen actividad inhibidora de farnesil transferasa.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un uso para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento sinérgico del cáncer.

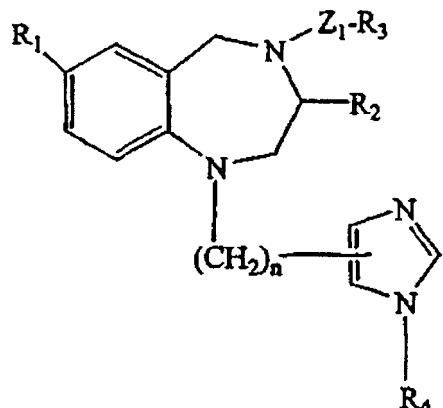
55 Estos y otros objetos de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la descripción de los mismos mostrada más adelante.

La presente invención proporciona un uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento sinérgico del cáncer en una especie de mamífero de (1) al menos un agente seleccionado entre el grupo constituido por paclitaxel, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona, CPT-11, gemcitabina, 4-(3-bromofenilamino)-6,7-bis(metoxi)quinazolina, gefitinib, trastuzumab, tamoxifeno, bicalutamida, y N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidincarboxamida; y (2) (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en el que el agente (1) se administra simultáneamente con o antes del compuesto (2).

ES 2 325 055 T3

En este documento se desvela un procedimiento sinérgico para el tratamiento del cáncer que comprende administrar a una especie de mamífero en necesidad del mismo una cantidad terapéutica y sinérgicamente eficaz de: (1) al menos un agente seleccionado entre el grupo constituido por agentes citotóxicos anti-proliferativos y agentes citoestáticos anti-proliferativos, y (2) un compuesto de fórmula I

5



10

15

20

25

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo donde

30

R₁ es Cl, Br, CN, fenilo opcionalmente sustituido, o 2-,3- o 4-piridilo opcionalmente sustituido;

R₂ es alquilo inferior opcionalmente sustituido, o aralquilo opcionalmente sustituido;

35

cada uno de R₃ y R₅ es, independientemente, alquilo inferior opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heterociclo opcionalmente sustituido;

R₄ es hidrógeno o alquilo inferior;

40

Z₁ es CO, SO₂, CO₂ o SO₂N(R₅)-; y

n es 1 ó 2;

45

con la condición de que el agente citotóxico y/o el agente citoestático se administren simultáneamente con o antes del compuesto de fórmula I.

En una realización preferida de la invención el agente (1) se administra antes de la administración del compuesto (2). En otra realización de la invención, el agente (1) se administra simultáneamente con el compuesto (2).

50

La Figura 1 ilustra que, en el modelo de carcinoma colorectal humano sólido HCT116 desarrollado en ratones desnudos, la inmensa mayoría de las células tumorales están en la fase de crecimiento no proliferativa (G₀). Las células no proliferativas presentes en un tumor sólido de tipo carcinoma de colon humano HCT-116 desarrolladas subcutáneamente se identificaron mediante un marcado prolongado con BrdUrd (24 h) por infusión continua. Sólo el 20% de la población total de las células tumorales dispersadas del tumor sólido se tiñeron en positivo para BrdUrd, que marca selectivamente las células proliferativas.

55

La Figura 2 ilustra la dirección selectiva de las células tumorales HCT-116 no proliferativas *in vitro* mediante el Compuesto 2. Las células tumorales en crecimiento exponencial (Día 2, células no confluentes y altamente proliferativas) eran >44 veces menos sensibles al Compuesto 2 (CI90 = 0,3 µM) que las células tumorales en la fase estacionaria de crecimiento (Día 8, células altamente confluentes y no proliferativas).

60

La Figura 3 ilustra la dirección selectiva de las células tumorales HCT-116 no proliferativas *in vitro* mediante el Compuesto 6. Las células tumorales en crecimiento exponencial (Día 2, células no confluentes y altamente proliferativas) eran ~67 veces menos sensibles al Compuesto 6 (CI90 = 1,04 µM) que las células tumorales en la fase de crecimiento estacionario (Día 8, células altamente confluentes y no proliferativas).

65

La Figura 4 ilustra la dirección selectiva de las células tumorales HCT-116 no proliferativas *in vitro* mediante el Compuesto 4. Las células tumorales en crecimiento exponencial (Día 2, células no confluentes y altamente prolife-

rativas) eran ~91,2 veces menos sensibles al Compuesto 4 ($CI_{90} = 1,05 \mu M$) que las células tumorales en fase de crecimiento estacionario (Día 8, células altamente confluentes y no proliferativas).

La Figura 5 ilustra que, a diferencia del Compuesto 2 y sus congéneres, los agentes anti-proliferativos tales como paclitaxel dirigen selectivamente las células tumorales HCT-116 proliferativas *in vitro*. Las células cancerosas en crecimiento exponencial (Día 2, células no confluentes y altamente proliferativas) eran >> 10 veces más sensibles a paclitaxel ($CI_{90} = 17,8 nM$) que las células tumorales en fase de crecimiento estacionario (Día 8, células altamente confluentes y no proliferativas).

La Figura 6 ilustra que las epotilonas, otra clase de agentes antiproliferativos, anti-neoplásicos, dirigen selectivamente las células proliferativas. En este ejemplo, las células cancerosas HCT116 en crecimiento exponencial (Día 2, células no confluentes y altamente proliferativas) eran >> 83 veces más sensibles a epotilona B ($CI_{90} = 1,3 nM$) que las células HCT116 en fase de crecimiento estacionario (Día 8, células altamente confluentes y no proliferativas).

La Figura 7 muestra los resultados de quimioterapia combinada con el Compuesto 2 y paclitaxel en la línea celular del carcinoma de colon humano, HCT116. Estos datos demuestran que el uso de un tratamiento combinado de Compuesto 2 y paclitaxel en el tratamiento de células cancerosas HCT116 *in vitro* daba como resultado una actividad anticancerosa claramente sinérgica. La secuencia mediante la cual se suministraban los dos agentes resultó ser importante para determinar si se obtendría sinergia o no. Paclitaxel administrado en primer lugar durante 20 h seguido de la administración del Compuesto 2 ($0,33 \mu M$) durante un segundo periodo de 20 h era claramente sinérgico, como lo era el tratamiento simultáneo con los dos agentes a las concentraciones indicadas durante 20 h. En contraste, se encontró que la combinación del Compuesto 2 ($0,3 \mu M$) seguido de paclitaxel era antagonista.

La Figura 8 muestra la quimioterapia combinada con el Compuesto 2 y el Compuesto 1 en la línea celular del carcinoma de colon humano HCT116. Estos datos demuestran que el uso de un tratamiento combinado del Compuesto 2 y el Compuesto 1 en el tratamiento de células cancerosas HCT116 *in vitro* daba como resultado una actividad anticancerosa claramente sinérgica. El compuesto 1 se administró en primer lugar durante 20 h seguido del Compuesto 2 ($1 \mu M$) durante un segundo periodo de tratamiento de 20 h.

Las Figuras 9 y 10 ilustran adicionalmente la sinergia de la quimioterapia combinada usando el Compuesto 2 y el Compuesto 1. La sinergia se obtuvo a un intervalo de concentraciones del Compuesto 1 y el Compuesto 2 y no parecía dependiente de una concentración particular de cada agente usado en la combinación. En el caso del Compuesto 2, concentraciones de $1 \mu M$ (Figura 8), $0,33 \mu M$ (Figura 9) y $0,11 \mu M$ (Figura 10) produjeron todas una interacción sinérgica con diversas concentraciones del Compuesto 1. En estos experimentos, el Compuesto 1 se administró en primer lugar durante 20 h seguido del Compuesto 2 durante un segundo periodo de tratamiento de 20 h.

La Figura 11 demuestra la sinergia *in vivo* en xenoinjertos de tumor humano (carcinoma de colon humano HCT116) desarrollados en ratones desnudos obtenidos siguiendo una quimioterapia combinada usando el Compuesto 2 y paclitaxel. En este experimento, el Compuesto 2 se administró por infusión iv prolongada (24 h) a una dosis de $125 mg/kg$. El paclitaxel se administró ip a una dosis de $24 mg/kg$ al final del periodo de infusión del Compuesto 2 (considerado administración simultánea).

La Figura 12 demuestra la sinergia *in vivo* en un xenoinjerto de tumor humano resistente a paclitaxel (carcinoma de ovario humano Pat-7) desarrollado en ratones desnudos siguiendo una quimioterapia combinada usando el Compuesto 2 y paclitaxel. El paclitaxel y el Compuesto 2 se administraron simultáneamente; el paclitaxel por la vía de administración iv y el Compuesto 2 por la vía de administración ip. Los datos mostrados eran los regímenes máximos tolerados: paclitaxel ($36 mg/kg$, iv, q3dx3); Compuesto 2 ($350 mg/kg$, ip, q3dx3).

La Figura 13 demuestra la sinergia terapéutica *in vivo* en xenoinjertos de tumor humano resistentes a multi-fármacos (carcinoma de colon humano HCTVM46) desarrollados en ratones desnudos siguiendo una quimioterapia combinada usando el Compuesto 2 y el Compuesto 1. El Compuesto 1 se administró por iv 24 h antes de la administración del Compuesto 2 por ip. Los datos mostrados eran los regímenes máximos tolerados: Compuesto 1 solo ($15 mg/kg$, q4dx3), Compuesto 2 solo ($400 mg/kg$, q4dx3), combinación (Compuesto 1 a $6 mg/kg$ seguido del Compuesto 2 a $400 mg/kg$).

La Figura 14 demuestra el programa de dependencia de la combinación del Compuesto 1 y el Compuesto 2 *in vivo* contra xenoinjertos de tumor humano resistentes a multi-fármacos (carcinoma de colon humano HCTVM46) desarrollados en ratones desnudos. En contraste con los otros programas descritos anteriormente, la administración del Compuesto 2 un día antes que el Compuesto 1 no dio como resultado sinergia terapéutica. Los datos mostrados eran regímenes máximos tolerados: Compuesto 1 solo ($10 mg/kg$, iv, q4dx3), Compuesto 2 solo ($400 mg/kg$, ip, q4dx3), combinación (Compuesto 2 a $300 mg/kg$ seguido de Compuesto 1 a $10 mg/kg$).

La Figura 15 demuestra que la quimioterapia combinada con Compuesto 2 y CPT-11 producía actividad antitumoral sinérgica en un carcinoma de colon humano HCT116 avanzado ($300-500 mg$) desarrollado en ratones desnudos. CPT-11 se administró 1 hora antes que el Compuesto 2. CPT-11 se administró IV en o cerca de su DMT de $30 mg/kg/iny$. El compuesto 2 se administró a dos niveles de dosis diferentes: 60 y $80 mg/kg/iny$, por IV.

ES 2 325 055 T3

La Figura 16 (A) demuestra que la quimioterapia combinada con gemcitabina (Gem) más el Compuesto 2 suscita la inhibición potenciada del crecimiento tumoral del carcinoma de colon humano HT-29. La Figura 16 (B) demuestra que la actividad antitumoral sinérgica resultante de la terapia combinada de gemcitabina y el Compuesto 2 se aplicaba también cuando se usó la regresión del tumor como un criterio de valoración para la respuesta del tumor. Gem se administró 1 hora antes que el Compuesto 2, Gem se administró IV a dos niveles de dosis, 24 y 36 mg/kg/iny, Q2D x 4 (DMT = 36 mg/kg/iny.). El compuesto 2 se administró a dos niveles de dosis diferentes: 60 y 80 mg/kg/iny, por IV.

La Figura 17 (A) demuestra que la quimioterapia combinada con paclitaxel (Ptxl) más el Compuesto 2 suscitaba la actividad antitumoral sinérgica, en términos de crecimiento tumoral, contra el carcinoma de colon humano HCT116. La Figura 17 (B) demuestra que la actividad antitumoral sinérgica resultante de la terapia combinada de paclitaxel y el Compuesto 2 se aplicaba también cuando la regresión del tumor y la velocidad de curación se usaron como criterios de valoración de la respuesta del tumor. Paclitaxel se administró 3 horas antes que el Compuesto 2. Paclitaxel se administró IV a 20 mg/kg/iny, Q7D x 4. El Compuesto 2 se administró a dos niveles de dosis diferentes: 40 y 80 mg/kg/iny, por IV.

Las Figuras 18A-18G muestran los efectos anti-cáncerosos de diversos agentes neoplásicos usados en solitario o en combinación. Los resultados muestran que el Compuesto 2 y un inhibidor de Her-1, (Compuesto 8) cuando se usan en combinación ejercen efectos citotóxicos sinérgicos *in vitro* contra la línea celular de cáncer SAL-2 activada por Her-1 (compárese la Figura 18B con la Figura 18D). Figura 18A: supervivencia clonogénica de la línea celular SAL-2 después de la exposición a paclitaxel durante 20 horas a las concentraciones indicadas. Figura 18B: supervivencia clonogénica de la línea celular SAL-2 después de la exposición al Compuesto 2 durante 20 horas a las concentraciones indicadas. Figura 18C: interacción antagonista entre paclitaxel y el inhibidor de Her-1, el Compuesto 8. Las células SAL-2 se expusieron en primer lugar al Compuesto 8 durante 20 horas antes de exponerlas adicionalmente a paclitaxel durante 20 horas más. Figura 18D: interacción sinérgica entre el Compuesto 2 y el inhibidor de Her-1, el Compuesto 8. Las células SAL-2 se expusieron en primer lugar al Compuesto 9 durante 20 horas antes de exponerlas adicionalmente al Compuesto 2 durante 20 horas más. El compuesto 2 potencia la actividad antitumoral del inhibidor de Her-1 (EGFR) Iressa® en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas humanas A431 que sobreexpresan Her-1 en ratones desnudos. Figura 18E: efectos combinados de Iressa® (200 mg/kg/adm, PO, Q1D x 11) y Compuesto 2 (60 mg/kg/iny., IV, Q2D x 5). La terapia con Iressa® se inició 3 días antes de comenzar el tratamiento con el Compuesto 2. Figura 18F: efectos combinados de Iressa® (200 mg/kg/adm, PO, Q1D x 11) y Compuesto 2 (80 mg/kg/iny., IV, Q2D x 5). Figura 18G: efectos combinados de Iressa® (200 mg/kg/adm, PO, Q1D x 11) y Paclitaxel (24 mg/kg/iny., IV, Q2D x 5).

La Figura 19 demuestra que el tratamiento combinado con el Compuesto 2 y Herceptina produjo una actividad antiproliferativa sinérgica contra la línea celular del carcinoma de mama humano BT474. El tratamiento con Herceptin® se inició 2 días antes que con el Compuesto 2, como se ilustra en la figura.

En la Figura 20 el Compuesto 2 potencia la actividad antitumoral de Tamoxifeno en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de mama humano dependiente de estrógeno MCF-7 en ratones desnudos. El Tamoxifeno se administró PO, Q2D x 14, el Compuesto 2 se administró PO durante 2 ciclos, Q1D x 10, como se ilustra en la figura.

En la Figura 21 el Compuesto 2 potencia la actividad antitumoral de la castración quirúrgica en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata humano MDA-PCa-2b dependiente de andrógenos en ratones desnudos. La castración quirúrgica se realizó en el Día 21 después del implante del tumor. La terapia con el compuesto 2 y paclitaxel se inició 3 días después de la castración quirúrgica. El compuesto 2 se administró PO, Q1D x10, Paclitaxel se administró IV, Q2D x 5.

En la Figura 22 el Compuesto 2 potencia la actividad antitumoral del inhibidor del receptor de andrógenos Casodex® contra un modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata humano MDA-PCa-2b-Al, sensible a Casodex®, independiente de andrógenos, en ratones desnudos. Casodex® se administró PO, Q1D x 10. La terapia con el Compuesto 2 se inició 3 días después de Casodex®. El compuesto 2 se administró PO, Q1D x10.

La Figura 23 demuestra que la combinación del inhibidor de CDK (CDKI), el Compuesto 9, con el Compuesto 2 producía efectos citotóxicos sinérgicos dependientes de la secuencia en células de cáncer de ovario humanas A2780 *in vitro*. Un tratamiento de 4 horas con 1,5 μ M del Compuesto 9 (sin efecto de la dosis) se combinó con un tratamiento de 20 horas de concentraciones en aumento del Compuesto 2. La formación de colonias se puntuó en el día 10. Panel A, el tratamiento con CDKI precedió al Compuesto 2. Panel B, el tratamiento con el Compuesto 2 precedió a CDKI.

Ventajosamente, la presente invención proporciona un uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento sinérgico del cáncer en una especie de mamífero de (1) al menos un agente seleccionado entre el grupo constituido por paclitaxel, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona,

CPT-11,
Gemcitabina,

4-(3-bromofenilamino)-6,7-bis(metoxi)quinazolina,

gefitinib,

5 trastuzumab,

tamoxifeno,

10 bicalutamida, y

10 N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidina-carboxamida; y (2)

(R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

15 en el que el agente (1) se administra simultáneamente con o antes del compuesto (2).

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso anterior proporciona un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer. Como se usa en este documento, el término “sinérgico” significa que el efecto conseguido con el uso de esta invención es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso que comprende el agente o agentes (1), y el compuesto (2) de esta invención por separado y en las cantidades empleadas en los procedimientos y composiciones de la misma. Ventajosamente, dicha sinergia entre los ingredientes activos permite el uso de menores dosis de uno o ambos ingredientes activos, permite el uso de menores dosis del agente o agentes anti-neoplásicos o terapia de radiación, proporciona mayor eficacia a las mismas dosis, y/o evita o retrasa la acumulación de resistencia multi-fármaco.

30 Otras ventajas sobre los procedimientos descritos previamente incluyen la capacidad de la presente combinación de compuestos de variar individualmente dependiendo de la naturaleza de las células cancerosas a tratar. Se anticipa también que el efecto terapéutico de las presentes composiciones puede conseguirse con menores cantidades del agente o agentes (1) y el compuesto (2) de lo que se requeriría si dichos agentes (1) y el compuesto (2) se administraran solos. Este procedimiento evita cualquier efecto tóxico adverso no basado en mecanismos que pudieran resultar de la administración de una cantidad de un agente o agentes (1) o un compuesto (2) o terapia de radiación sola suficiente para conseguir el mismo efecto terapéutico. Las presentes composiciones consiguen un efecto terapéutico sinérgico y presentan ventajas terapéuticas inesperadas sobre el efecto de cualquiera de los componentes, compuestos o procedimientos cuando se administran en solitario.

40 La extensión de la selectividad de los dos o más agentes anti-cáncerosos, que comprende el uso de la presente invención proporciona ventajas terapéuticas sobre los procedimientos descritos previamente de usar un solo agente anti-neoplásico para el tratamiento del cáncer. En particular, el uso de dos o más componentes activos farmacéuticamente independientes que tienen actividades complementarias, esencialmente no solapantes permite a la persona que está utilizando el presente medicamento variar independientemente y con precisión la actividad de la combinación sin tener que sintetizar un solo fármaco que tenga un perfil de actividad farmacéutica particular. Además, dichas combinaciones deberían dirigir eficazmente tales células tanto proliferativas como no proliferativas.

45 El agente o agentes (1) pueden administrarse simultáneamente con o antes del compuesto (2). En una realización preferida de la presente invención, el agente o agentes (1) se administran antes del compuesto (2). Como se usa en este documento, el término “simultáneo” o “simultáneamente” significa que el agente o agentes (1) y el compuesto (2) se administran a las 24 horas, preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 6 horas, y aún más preferiblemente 3 horas o menos, de la administración del otro.

50 Además del agente o agentes (1) descritos anteriormente, los agentes que hacen que las células se hagan “no proliferativas” o “quiescentes”, denominados en este documento “agentes citoestáticos anti-proliferativos” o “agentes de quiescencia”, pueden administrarse opcionalmente a un paciente en necesidad de los mismos. Los agentes citoestáticos anti-proliferativos pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente con el compuesto (2) y los agentes (1).

60 La presente invención proporciona un uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento sinérgico de diversos cánceres, incluyendo, aunque sin limitación, los siguientes:

carcinoma incluyendo el de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer pulmonar microcítico y macrocítico y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello del útero, tiroides y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos del linaje linfoide incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico, y linfoma de Burkitts;

ES 2 325 055 T3

tumores hematopoyéticos del linaje mieloide incluyendo leucemias mielogenosas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide, y leucemia promielocítica;

5 tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwanomas;

5 tumores de origen mesenquímico incluyendo fibrosarcoma, rabdomioscarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores incluyendo melanoma, xenoderma pigmentosa, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo, y teratocarcinoma.

10 Más preferiblemente, la invención se usa para tratar cánceres acelerados o metastáticos de la vejiga, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer pulmonar macrocítico, cáncer colorectal, y cáncer de mama.

15 En una realización preferida de esta invención, un uso para la preparación de un medicamento se proporciona para el tratamiento sinérgico de tumores cancerosos. Ventajosamente, el uso sinérgico de esta invención reduce el desarrollo de tumores, reduce la carga tumoral, o produce la regresión del tumor en un hospedador mamífero.

20 Como se usa en este documento, la expresión “terapia de radiación” incluye, aunque sin limitación, rayos x o rayos gamma que se suministran desde una fuente aplicada externamente tal como un haz o por implante de fuentes radiactivas pequeñas. Las terapias de radiación pueden considerarse también un agente citotóxico anti-prolífératio-

25 Como se usa en este documento, la expresión “agente anti-neoplásico” es sinónimo de “agente quimioterapéutico” y se refiere a compuestos que evitan que las células cancerosas se multipliquen (es decir, agentes anti-proliferativos). Los agentes citotóxicos evitan que las células cancerosas se multipliquen: (1) interfiriendo con la capacidad de la célula para replicar el ADN y (2) induciendo la muerte y/o apoptosis celular en las células cancerosas. Los agentes anti-proliferativos citoestáticos o quiescentes actúan modulando, interfiriendo o inhibiendo los procedimientos de la transducción celular de señales que regulan la proliferación celular. La mayoría de agentes quimioterapéuticos son citotóxicos y se dirigen a células proliferativas.

30 Las clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos anti-proliferativos incluyen las siguientes:

35 Agentes de alquilación (incluyendo, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, Clormetina, Ciclofosfamida (Cytoxan®), ifosfamida, Melfalan, Clorambucil, Pipobroman, Trieten-melamina, Trieten-tiofosforamina, Busulfan, Carmustina, Lomustina, Estreptozocina, Dacarbazine, y Temozolomida.

40 Antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): Metotrexato, 5-Fluorouracilo, Floxuridina, Citarabina, 6-Mercaptopurina, 6-Tioguanina, fosfato de Fludarabina, Pentoestatina, y Gemcitabina.

45 Productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfoquinas y epipodofilotoxinas): Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Bleomicina, Dactinomicina, Daunorubicina, Doxorubicina, Epirubicina, Idarubicina, Ara-C, paclitaxel (paclitaxel está disponible en el mercado como Taxol®), Mitramicina, Dexoxicomicina, Mitomicina-C, L-Asparaginasa, Interferones (especialmente IFN-a), Etoposido, y Teniposido.

50 Otros agentes citotóxicos anti-proliferativos son navelbeno, CPT-11, anastrazol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosfamida, y droloxafina.

55 Los agentes que afectan a los microtúbulos interfieren con la mitosis celular y se conocen bien en la técnica por su actividad citotóxica anti-proliferativa. Los agentes que afectan a los microtúbulos incluyen, aunque sin limitación, alocolquicina (NSC 406042), Halicondrina B (NSC 609395), colquicina (NSC 757), derivados de colquicina (por ejemplo, NSC 33410), dolaestatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol®, NSC 125973), derivados de Taxol® (por ejemplo, derivados (por ejemplo, NSC 608832), tiocolquicina NSC 361792), cisteína de tritilo (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas incluyendo, aunque sin limitación, epotilona A, epotilona B, y discodermolida (véase Service, (1996) Science, 274:2009) estramustina, nocodazol, MAP4, y similares. Los ejemplos de dichos agentes se describen también en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Bulinski (1997) J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94:10560-10564; Muhradt (1997) Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou (1997) Nature 387:268-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell. 8:973-985; Panda (1996) J. Biol. Chem. 271:29807-29812.

60 El término “paclitaxel” como se usa en este documento se refiere al fármaco disponible en el mercado como Taxol® (número NSC: 125973). Taxol® inhibe la replicación de las células eucariotas potenciando la polimerización de los restos de tubulina en haces de microtúbulos estabilizados que son incapaces de reorganizarse en las estructuras apropiadas para la mitosis. De los muchos fármacos quimioterapéuticos disponibles, paclitaxel ha generado interés debido a su eficacia en ensayos clínicos contra tumores refractarios a fármacos, incluyendo tumores de ovario y

ES 2 325 055 T3

de la glándula mamaria (Hawkins (1992) Oncology, 6: 17-23, Horwitz (1992) Trends Pharmacol. Sci. 13: 134-146, Rowinsky (1990) J. Natl. Canc. Inst. 82: 1247-1259).

En este documento se desvelan compuestos con actividad parecida a paclitaxel. Éstos incluyen, aunque sin limitación, paclitaxel y derivados de paclitaxel (compuestos parecidos a paclitaxel) y análogos. Paclitaxel y sus derivados están disponibles en el mercado. Además, los procedimientos de fabricación de paclitaxel y derivados y análogos de paclitaxel los conocen bien los especialistas en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N°: 5.569.729; 5.565.478; 5.530.020; 5.527.924; 5.508.447; 5.489.589; 5.488.116; 5.484.809; 5.478.854; 5.478.736; 5.475.120; 5.468.769; 5.461.169; 5.440.057; 5.422.364; 5.411.984; 5.405.972; y 5.296.506).

De esta manera, los agentes (1) que son adecuado para usar en la presente invención incluyen paclitaxel (conocido también como Taxol®), y [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7-11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona (descrita en el documento WO 99/02514).

Además los agentes (1) incluyen bicalutamida, Herceptin® (trastuzumab). Algunos agentes (1) especialmente preferidos son paclitaxel, gemcitabina, y CPT-11.

En una realización de esta invención, las células proliferativas cancerosas se hacen no proliferativas antes o durante el tratamiento de acuerdo con la presente invención por tratamiento con un agente citoestático. Como se usa en este documento, “agente citoestático” es sinónimo de “agente de quiescencia” y se refiere a cualquier medio para ralentizar la velocidad de la división celular o del crecimiento tumoral de manera que las células se hacen no proliferativa o de manera que su comportamiento se aproxima al de las células no proliferativas. Los agentes anti-proliferativos citoestáticos o “quiescentes” ejemplares para usar en la invención, incluyen sin limitación, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17a-Etinilestradiol, Dietilestilbestrol, Testosterona, Prednisona, Fluoximasterona, propionato de Dromostanolona, Testolactona, acetato de Megestrol, Metil-prednisolona, Metil-testosterona, Prednisolona, Tri-amcinolona, clorotrianiiseno, Hidroxiprogesterona, Aminoglutetimida, Estramustina, acetato de Medroxiprogesterona, Leuprolida, Flutamida, Toremifeno, Zoladex.

Son también adecuados para el uso como agentes citoestáticos los antiangiogénicos tales como los inhibidores de metaloproteinasa de matriz, y otros inhibidores de VEGF, tales como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU6668 se incluyen también. Los anticuerpos anti-Her2 de Genetech pueden utilizarse también. Un inhibidor de EGFR adecuado es EKB-569 (un inhibidor irreversible). Se incluyen también el anticuerpo C225 de Imclone inmunoespecífico para el EGFR, e inhibidores de src.

También es adecuado para usarlo como un agente citoestático antiproliferativo Casodex® (bicalutamida, Astra Zeneca) que hace no proliferativos a los carcinomas dependientes de andrógeno. Otro ejemplo más de un agente citoestático es el antiestrógeno Tamoxifeno que inhibe la proliferación o crecimiento de cáncer de mama dependiente de estrógeno. Los inhibidores de la transducción de señales proliferativas celulares son agentes citoestáticos. Los ejemplos son inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de quinasa MEK-1, inhibidores de quinasa MAPK, inhibidores de PI3, inhibidores de quinasa Src, e inhibidores de PDGF.

Como se ha mencionado, los agentes citoestáticos comprenden también agentes anti-angiogénicos y antivasculares que, interrumpiendo el flujo sanguíneo a los tumores sólidos, hacen a las células cancerosas quiescentes, privándolas de nutrición. La castración, que igualmente hace no proliferativos a los carcinomas dependientes de andrógeno, puede utilizarse también. La inanición por medios distintos de la interrupción quirúrgica del flujo sanguíneo es otro ejemplo de un agente citoestático. Una clase particularmente preferida de agentes citoestáticos antivasculares son las combretastatinas. Otros agentes citoestáticos ejemplares incluyen inhibidores de quinasa MET, inhibidores de quinasa MAP, inhibidores de tirosina quinasas no receptoras y receptoras, inhibidores de la señalización de integrina, e inhibidores de receptores del factor de crecimiento similares a insulina.

En las realizaciones preferidas de la invención, el uso supone la administración de una combinación de dos o más agentes anti-neoplásicos. Por ejemplo, los datos presentados en este documento muestran que los xenoinjertos MDA-PCa-2b de cáncer de próstata humano se hacen quiescentes castrando quirúrgicamente los animales hospedadores antes de tratarlos con el compuesto (2).

Los procedimientos para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos los conocen los especialistas en la técnica. Además, su administración se describe en la bibliografía convencional. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en “Physicians’ Desk Reference” (PDR), por ejemplo, edición de 1996 (Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645-1742, EE.UU.); cuya descripción se incorpora en este documento como referencia a la misma.

El Compuesto (2) de la presente invención incluye:

(R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-ilmetil)-3-(fenilmethyl)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo;

ES 2 325 055 T3

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 La sal del ácido metanosulfónico de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)3-(fenilmethyl)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo es particularmente preferida para usarla en la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, el agente (1) se selecciona entre el grupo constituido por paclitaxel, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-2-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona y el compuesto (2) es (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmethyl)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otra realización preferida, el agente (1) es paclitaxel y el compuesto (2) es (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmethyl)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En otra realización preferida de esta invención, el agente (1) es [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo-[4.1.0]heptadecano-5,9-diona y el compuesto (2) es (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmethyl)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 El uso de un agente seleccionado entre el grupo constituido por Herceptin®, Tamoxifeno es particularmente preferido para usar en la combinación de la invención.

25 Cuando se describen los compuestos de fórmula I, la expresión “alquilo inferior” o “alq inferior” (como parte de otro grupo) se refiere a un grupo alquilo no sustituido de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4, átomos de carbono.

30 El término “aralquilo” se refiere a un grupo arilo unido directamente mediante un grupo alquilo inferior. Un grupo aralquilo preferido es berilo.

35 El término “arilo” se refiere a un grupo hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico que tiene de 6 a 12 átomos de carbono en la parte del anillo. Son ejemplos de arilo en este documento los grupos fenilo, naftilo y bifenilo.

40 El término “heterociclo” se refiere a un grupo cíclico aromático o no aromático, totalmente saturado o insaturado que es un sistema de anillo monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclico de 7 a 11 miembros, o tricíclico de 10 a 15 miembros que tiene al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene átomos de carbono. Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede tener 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, oxígeno y azufre donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse también opcionalmente y los heteroátomos de nitrógeno pueden cuaternizarse también opcionalmente. El grupo heterociclo puede unirse a cualquier heteroátomo o átomo de carbono.

45 Los grupos heterociclo monocíclicos ejemplos incluyen pirrolidinilo, pirrolilo, indolilo, pirazolilo, oxetanilo, pirazolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, furilo, tetrahidrofurilo, tienilo, oxadiazolilo, piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxo-piperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxazepinilo, azepinilo, 4-piperidonilo, piridilo, N-oxo-piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinil sulfóxido, tetrahidrotiopirahilsulfona, tiamorfolinil sulfona, 1,3-dioxolano, tetrahidro-1,1-dioxotienilo, dioxanilo, isotiazolidinilo, tietanilo, tiiranilo, triazinilo, triazolilo, y similares.

50 Los grupos heterociclo bicíclicos ejemplos incluyen benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzotienilo, quinolinilo, quinolinil-N-óxido, tetrahidroisoquinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzopiranilo, indolizinilo, benzofurilo, cromonilo, cumarinilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo (tal como furo[2,3-c]piridinilo, furo[3,1-b]piridinilo o furo[2,3-b]piridinilo), dihidroisoindolilo, dihidroquinazolinilo (tal como 3,4-dihidro-4-oxo-quinazolinilo), bencisotiazolilo, bencisoazolilo, benzodiazinilo, benzofuranilo, benzotripiranilo, benzotriazolilo, benzpirazolilo, dihidrobenzofurilo, di-hidrobenzotienilo, dihidrobenzotripiranilo, dihidrobenzotriopiranil sulfona, dihidrobenzopiranilo, indolinilo, iso-cromanilo, isoindolinilo, naftiridinilo, ftalazinilo, piperonilo, purinilo, piridopiridilo, quinazolinilo, tetrahidroquinolinilo, tienofurilo, tienopiridilo, tienotienilo, y similares.

55 Cuando un grupo se dice que está opcionalmente sustituido, puede estar sustituido con uno a cinco, preferiblemente de uno a tres, sustituyentes tales como F, Cl, Br, I, trifluorometilo, trifluorometoxi, hidroxi, alcoxi inferior, cicloalcoxi, heterociclooxi, oxo, alcanoilo inferior, ariloxi, alcanoiloxi inferior, amino, alquilamino inferior, arilamino, aralquilamino, cicloalquilamino, heterocicloamino, aminas disustituidas en las que los dos sustituyentes amino se seleccionan independientemente entre alquilo, arilo o aralquilo inferior, alcanoilamino inferior, aroilamino, aralcanoilamino, alcanoilamino inferior sustituido, arilamino sustituido, aralquilanoilamino sustituido, tiol, alquiltio inferior, ariltio, aralquiltio, cicloalquiltio, heterociclotio, alquiltiono inferior, ariltiono, aralquiltiono, alquilsulfonilo inferior, arilsulfonilo, aralquilsulfonilo, sulfonamida (por ejemplo, SO_2NH_2), sulfonamida sustituida, nitro, ciano, carboxi, carbamilo (por ejemplo, CONH_2), carbamilo sustituido (por ejemplo, CONH-alquilo inferior, CONH-arilo, CONH-aralquilo o casos en los que hay dos sustituyentes en el nitrógeno seleccionados independientemente entre alquilo inferior,

ES 2 325 055 T3

5 arilo o aralquilo), alcoxi carbonilo inferior, arilo, arilo sustituido, guanidino, y heterociclos (por ejemplo, indolilo, imidazolilo, furilo, tienilo, tiazolilo, pirrolidilo, piridilo, pirimidilo y similares). Cuando anteriormente se ha indicado que el sustituyente está sustituido adicionalmente, estará sustituido con F, Cl, Br, I, alquilo inferior opcionalmente sustituido, hidroxi, alcoxi inferior opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o aralquilo opcionalmente sustituido.

10 Se contemplan todos los estereoisómeros de los compuestos de fórmula I, como mezcla o en forma pura o sustancialmente pura. La definición de los compuestos de fórmula I abarca todos los posibles estereoisómeros y sus mezclas. La definición de la fórmula I abarca muy particularmente las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados que tienen la actividad especificada.

15 Los compuestos de fórmula I pueden prepararse por los procedimientos descritos en el documento U.S. 6.011.029. Todas las solicitudes y patentes a las que se hace referencia en este documento se incorporan por la presente como referencia.

20 15 El compuesto (2) es útil en diversas formas de sal farmacéuticamente aceptables. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas formas de sal que serían evidentes para un farmacéutico, es decir, aquellas que son sustancialmente no tóxicas y que proporcionan las propiedades farmacocinéticas, palatabilidad, absorción, distribución, metabolismo o excreción deseadas. Otros factores, de naturaleza más práctica, que también son importantes en la selección, son el coste de los materiales de partida, la facilidad de cristalización, el rendimiento, la estabilidad, la higroscopidad y la fluidez del fármaco a granel resultante. Convenientemente, las composiciones farmacéuticas pueden prepararse a partir de los ingredientes activos o sus sales farmacéuticamente aceptables junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

25 30 Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto (2) que son adecuadas para usar en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, sales formadas con diversos ácidos orgánicos e inorgánicos tales como cloruro de hidrógeno, ácido hidroximetano sulfónico, bromo ácido, ácido metanosulfónico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido maleico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido sulfámico, ácido glicólico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido málico, ácido pamoico, ácido sulfánlico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido fumárico, ácido toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido oxálico, ácido isetiónico, e incluyen otras diversas sales farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, nitratos, fosfatos, boratos, tartratos, citratos, succinatos, benzoatos, ascorbatos, salicilatos, y similares. Se contemplan cationes tales como iones de amonio cuaternario como contraíones farmacéuticamente aceptables para restos aniónicos.

35 40 Las sales preferidas de los compuestos (2) incluyen sales clorhidrato, sales de ácido metanosulfónico y sales de ácido trifluoroacético, siendo las sales de ácido metanosulfónico las más preferidas. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I pueden formarse metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; bases orgánicas tales como diciclohexilamina, tributilamina, y piridina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

45 Las sales farmacéuticamente aceptables para usar en la presente invención pueden sintetizarse por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, las sales se preparan haciendo reaccionar la base libre o el ácido con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido o base orgánico o inorgánico formador de sal deseado, en un disolvente adecuado o una combinación de disolventes.

50 55 La presente invención abarca también el uso de una composición farmacéutica útil en el tratamiento del cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las combinaciones usadas en esta invención, con o sin vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas sinérgicas usadas en esta invención comprenden un agente (1), un agente de quiescencia opcional, un compuesto (2), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención implica el uso de un agente (1) junto con el compuesto (2). Las composiciones usadas en la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables adicionales tales como alumbre, estabilizadores, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes aromatizantes, adyuvantes, y similares. Los agentes (1), el compuesto (2) y las composiciones usadas en la presente invención pueden administrarse por vía oral o parenteral incluyendo las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

60 65 Para uso oral, los agentes (1), el compuesto (2) y las composiciones usadas en esta invención pueden administrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables, u obleas, o en forma de soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco, y azúcar, y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio se añaden habitualmente. Para administración oral en forma de cápsula, los vehículos útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco, y azúcar. Cuando se usan suspensiones acuosas para la administración oral, habitualmente se añaden agentes de emulsión y/o suspensión. Además, pueden añadirse agentes edulcorantes y/o aromatizantes a las composiciones orales. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, normalmente se emplean soluciones estériles del ingrediente o ingredientes activos, y el pH de las soluciones debería ajustarse y tamponarse adecuadamente. Para uso intravenoso, la concentración total del soluto o solutos debería controlarse para hacer a la preparación isotónica. En una realización preferida de la presente invención, el compuesto (2) o las sales

ES 2 325 055 T3

farmacéuticamente aceptables del mismo se formulan con una sulfobutiléter-7- β -cicladextrina o una 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina para administración intravenosa.

Para preparar supositorios para usarlos en la invención, una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácido graso o manteca de cacao se funde en primer lugar, y el ingrediente activo se dispersa homogéneamente en la cera, por ejemplo por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes dimensionados convenientemente y se permite que se enfrie y, de esta manera, solidifique.

Las preparaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Dichas preparaciones se ejemplifican mediante agua o agua/soluciones de propilenglicol para inyección parenteral. Las preparaciones líquidas pueden incluir también soluciones para administración intranasal.

Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo que pueden estar junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un gas inerte comprimido.

Se incluyen también preparaciones sólidas que se pretende convertir, poco antes de su uso, en preparaciones líquidas para administración oral o parenteral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

El compuesto (2), así como los agentes (1), descritos en este documento pueden suministrarse también por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tomar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o depósito como es convencional en la técnica para este fin.

Las combinaciones usadas en la presente invención pueden usarse también junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad particular contra la afección que se está tratando.

Si se formulan en forma de dosis fija, los ingredientes activos de las composiciones combinadas usadas en esta invención se emplean dentro de los intervalos de dosificación descritos a continuación. Como alternativa, los agentes (1), y los compuestos (2) pueden administrarse por separado en los intervalos de dosificación descritos a continuación. En una realización preferida de la presente invención, el agente anti-neoplásico se administra en el intervalo de dosificación descrito a continuación antes de la administración del compuesto de fórmula I en el intervalo de dosificación descrito a continuación.

La Tabla I indica combinaciones quimioterapéuticas preferidas y dosificaciones ejemplares para usar en la presente invención.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 325 055 T3

	COMBINACIÓN QUIMIOTERAPÉUTICA	DOSIFICACIÓN mg/m ² (por dosis)
5	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Cisplatino (Referencia)	5-150 mg/m ²
10	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Carboplatino (Referencia)	5-1000 mg/m ²
15	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Radiación (Referencia)	200-8000 cGy
20	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ CPT-11	5-400 mg/m ²
25	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Paclitaxel	40-250 mg/m ²
30	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Paclitaxel	40-250 mg/m ²
	+ Carboplatino	5-1000 mg/m ²
35	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ 5FU y opcionalmente	5-5000 mg/m ²
40	+ Leucovorina (Referencia)	5-1000 mg/m ²
45	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Epotilona (Referencia)	1-500 mg/m ²
50	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Gemcitabina	100-3000 mg/m ²
55	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ UFT y opcionalmente	50-800 mg/m ²
	+ Leucovorina (Referencia)	5-1000 mg/m ²
60	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²

ES 2 325 055 T3

	COMBINACIÓN QUIMIOTERAPÉUTICA	DOSIFICACIÓN mg/m ² (por dosis)
5	+ Gencitabina	100-3000 mg/m ²
	+ Cisplatino	5-150 mg/m ²
10	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ UFT	50-800 mg/m ²
15	+ Leucovorina (Referencia)	5-1000 mg/m ²
20	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Cisplatino	5-150 mg/m ²
	+ Paclitaxel	40-250 mg/m ²
25	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Cisplatino	5-150 mg/m ²
	+ 5FU (Referencia)	5-5000 mg/m ²
30	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ Oxaliplatino	5-200 mg/m ²
	+ CPT-11	4-400 mg/m ²
35	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ 5FU	5-5000 mg/m ²
40	+ CPT-11 y opcionalmente	4-400 mg/m ²
	+ Leucovorina	5-1000 mg/m ²
45	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ 5FU	5-5000 mg/m ²
50	+ Radiación (Referencia)	200-8000 cGy
55	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
	+ radiación	200-8000 cGy
	+ 5FU	5-5000 mg/m ²
	+ Cisplatino (Referencia)	5-150 mg/m ²
60	Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²

ES 2 325 055 T3

COMBINACIÓN QUIMIOTERAPÉUTICA	DOSIFICACIÓN mg/m ² (por dosis)
+ Oxaliplatino	5-200 mg/m ²
+ 5FU y opcionalmente	5-5000 mg/m ²
+ Leucovorina (Referencia)	5-1000 mg/m ²
Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
+ Paclitaxel	40-250 mg/m ²
+ CPT-11	4-400 mg/m ²
Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
+ Paclitaxel	40-250 mg/m ²
+ 5-FU	5-5000 mg/m ²
Compuesto (2)	2,5-750 mg/m ²
+ UFT	50-800 mg/m ²
+ CPT-11 y opcionalmente	4-400 mg/m ²
+ Leucovorina	5-1000 mg/m ²

En la Tabla I anterior, "5FU" se refiere a 5-fluorouracilo, "Leucovorina" puede emplearse en forma de leucovorina cálcica, "UFT" es una proporción molar 1:4 de tegafur:uracilo, y "Epotilona" es preferiblemente un compuesto descrito en los documentos WO 99/02514 o WO 00/50423, incorporados ambos como referencia en este documento en su totalidad.

Aunque la Tabla 1 proporciona intervalos de dosificación ejemplares del compuesto (2) y ciertos agentes anti-cáncerosos usados en la invención, cuando se formulan las composiciones farmacéuticas usadas en la invención el médico puede utilizar dosificaciones preferidas si lo justifica la afección del paciente que se está tratando. Por ejemplo, el Compuesto 2 puede administrarse preferiblemente a una dosificación que varía de aproximadamente 25-500 mg/m² cada tres semanas durante tanto tiempo como lo requiera el tratamiento. Las dosificaciones preferidas para cisplatino son de aproximadamente 75-120 mg/m² administrado cada tres semanas. Las dosificaciones preferidas para carboplatino están dentro del intervalo de aproximadamente 200-600 mg/m² o un ABC de aproximadamente 0,5-8 mg/ml x min; lo más preferido es un ABC de aproximadamente 4-6 mg/ml x min. Cuando el procedimiento empleado utiliza radiación, las dosificaciones preferidas están dentro del intervalo de aproximadamente 200-6000 cGY. Las dosificaciones preferidas para CPT-11 están dentro de aproximadamente 100-125 mg/m², una vez a la semana. Las dosificaciones preferidas para paclitaxel son de aproximadamente 130-225 mg/m² cada 21 días. Las dosificaciones preferidas para gemcitabina están dentro del intervalo de aproximadamente 80-1500 mg/m² administrado semanalmente. Preferiblemente, se usa UFT dentro de un intervalo de aproximadamente 300-400 mg/m² por día cuando se combina con la administración de leucovorina. Las dosificaciones preferidas para leucovorina son de aproximadamente 10-600 mg/m² administrados semanalmente.

La dosificación real empleada puede variarse dependiendo de los requisitos del paciente y de la gravedad de la afección que se está tratando. La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de las capacidades del especialista en la técnica. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones bajas que son menores que las dosis óptimas de compuesto. Posteriormente, la dosificación aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias concretas. Por conveniencia, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día si se desea. Puede usarse también una terapia intermitente (por ejemplo, una semana de cada tres o tres de cada cuatro semanas).

Ciertos cánceres pueden tratarse eficazmente con el compuesto (2) y una pluralidad de agentes anti-cáncerosos. Dichas combinaciones triples y cuádruples pueden proporcionar una mayor eficacia. Cuando se usan en dichas combinaciones triples y cuádruples pueden utilizarse las dosificaciones indicadas anteriormente. Otras de estas combinaciones en la Tabla 1 anterior pueden incluir, por lo tanto, el "Compuesto 2" junto con herceptina + taxano. 5-FU puede sustituirse por UFT en cualquiera de las combinaciones anteriores.

ES 2 325 055 T3

Cuando se emplea la presente invención, pueden administrarse también, si se desea, otros agentes usados en la modulación del crecimiento o metástasis de tumores en un marco clínico, tales como antieméticos.

- Pueden realizarse también estudios clínicos que emplean la quimioterapia combinada usada en la invención. Para dichos estudios se prefiere particularmente la administración de una infusión de aproximadamente 3 horas de Taxol® (135 mg/m²) seguido de una infusión de aproximadamente 1 hora del compuesto 2 (50 mg/m²) a intervalos de tres semanas. En otro protocolo, se infunde Taxol® (80 mg/m²) durante aproximadamente una hora seguido de infusión del compuesto 2 (80 mg/m²). Este protocolo implica una administración semanal. Otro protocolo implica la administración de una combinación triple que comprende aproximadamente una infusión de 3 horas de Taxol® (135 mg/m²) seguido de una infusión de aproximadamente veinte minutos de carboplatino (ABC = 6), administrándose el Taxol® y el carboplatino de esta manera cada tres semanas. En este protocolo, el compuesto 2 se administra a los pacientes semanalmente en una infusión de aproximadamente una hora a 80 mg/m².

- La presente invención abarca el uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento sinérgico de cáncer en el que un agente (1) y el compuesto (2) se administran simultáneamente o secuencialmente. De esta manera, aunque una formulación farmacéutica que comprende el agente o agentes (1) y el compuesto (2) puede ser ventajosa para administrar la combinación para un tratamiento particular, la administración previa del agente o agentes (1) puede ser ventajosa en otro tratamiento. Se entiende también que la presente combinación de agente o agentes (1) y compuesto (2) puede usarse junto con otros procedimientos de tratamiento del cáncer (preferiblemente tumores cancerosos) incluyendo, aunque sin limitación, terapia de radiación y cirugía. Se entiende también, adicionalmente, que el agente (1), si lo hubiera, puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con todos o cualquiera de las otras terapias sinérgicas.

- Las combinaciones usadas en la presente invención pueden co-administrarse también con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su utilidad particular contra la afección que se está tratando. Las combinaciones usadas en la presente invención, como alternativa, pueden usarse secuencialmente con un agente o agentes farmacéuticamente aceptables cuando una formulación de combinación múltiple es inapropiada.

- El agente o agentes quimioterapéuticos y/o la terapia de radiación pueden administrarse de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Resultará evidente para los especialistas en la técnica que la administración del agente o agentes quimioterapéuticos y/o la terapia de radiación pueden variarse dependiendo de la enfermedad que se está tratando y de los efectos conocidos del agente o agentes quimioterapéuticos y/o la terapia de radiación sobre esa enfermedad. También, de acuerdo con los conocimientos del médico especialista, los protocolos terapéuticos (por ejemplo, cantidades de dosificación y tiempos de administración) pueden variarse en vista de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados (es decir, agente o agentes anti-neoplásicos o radiación) sobre el paciente, y en vista de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

- En el uso de esta invención, el compuesto (2) se administra simultáneamente o secuencialmente con un agente o agentes (2). De esta manera, no es necesario que el agente o agentes (1) y el compuesto (2) se administren simultáneamente o esencialmente simultáneamente. La ventaja de una administración simultánea o esencialmente simultánea está dentro de la determinación del médico especialista.

- También, en general, el compuesto (2), el agente o agentes (1) no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica y, debido a sus diferentes características físicas y químicas, pueden administrarse por vías diferentes. Por ejemplo, el compuesto (2) puede administrarse por vía oral para generar y mantener unos buenos niveles en sangre del mismo, mientras que el agente o agentes (1) pueden administrarse por vía intravenosa. La determinación del modo de administración y la conveniencia de administración, cuando sea posible, en la misma composición farmacéutica, está dentro de los conocimientos del médico especialista. La administración inicial puede realizarse de acuerdo con protocolos establecidos conocidos en la técnica, y después, basándose en los efectos observados, el médico especialista puede modificar la dosificación, los modos de administración y los tiempos de administración.

- La elección particular del compuesto (2) y el agente o agentes (1) dependerá del diagnóstico de los médicos asistentes y de su juicio de la afección del paciente y el protocolo de tratamiento apropiado. El compuesto (2) y/o el agente o agentes (1) pueden administrarse concurrentemente (por ejemplo, simultáneamente, esencialmente simultáneamente o dentro del mismo protocolo de tratamiento) o secuencialmente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad proliferativa, el estado del paciente, y la elección real del agente o agentes (1) a administrar junto con (es decir, dentro de un solo protocolo de tratamiento) el compuesto (2).

- Si el compuesto (2) y el agente o agentes (1) no se administran simultáneamente o esencialmente simultáneamente, entonces el orden inicial de administración del compuesto (2), y el agente o agentes (1) pueden variarse. De esta manera, por ejemplo, el compuesto (2) pueden administrarse en primer lugar seguido de la administración del agente o agentes (1); o el agente o agentes (1) pueden administrarse en primer lugar seguido de la administración del compuesto (2). Esta administración alterna puede repetirse durante un único protocolo de tratamiento. La determinación del orden de administración, y el número de repeticiones de la administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento, está dentro de los conocimientos del médico especialista después de la evaluación de la enfermedad que se está tratando y el estado del paciente. Por ejemplo, el agente o agentes (1) pueden administrarse inicialmente. El tratamiento se continua entonces con la administración del compuesto (2) y opcionalmente va seguido de la administración de un agente citoestático hasta que se completa el protocolo de tratamiento.

ES 2 325 055 T3

De esta manera, de acuerdo con la experiencia y el conocimiento, el médico practicante puede modificar cada protocolo para la administración de un componente (un agente terapéutico - es decir, el compuesto (2), el agente o agentes (1) del tratamiento de acuerdo con las necesidades del paciente individual, a medida que transcurre el tratamiento.

5 El médico asistente, para juzgar si el tratamiento es eficaz a la dosificación administrada, considerará el bienestar general del paciente así como las señales más inequívocos tales como el alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, la inhibición del crecimiento del tumor, la contracción real del tumor o la inhibición de la metástasis. El tamaño del tumor puede medirse por procedimientos convencionales tales como estudios radiológicos, por ejemplo, 10 exploración CAT o MRI, y pueden usarse mediciones sucesivas para juzgar si el crecimiento del tumor se ha retardado o no o incluso si se ha invertido. El alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad tales como dolor, y mejora del estado global puede usarse también para ayudar a juzgar la eficacia del tratamiento.

15 Para facilitar una mejor comprensión de la invención, se presentan los siguientes ejemplos fundamentalmente con el fin de ilustrar los detalles más específicos de la misma. El alcance de la invención no debería considerarse limitado por los ejemplos, sino que abarca todo el contenido definido por las reivindicaciones.

Protocolo experimental

20 *Compuestos*

Las siguientes denominaciones se usan para identificar los compuestos de ensayo a través de los ejemplos:

25 Compuesto 1: [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona

Compuesto 2: (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo, sal clorhidrato

30 Compuesto 3: (R)-4-(butilsulfonil)-7-ciano-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-1H-1,4-benzodiazepina, sal clorhidrato (Referencia)

Compuesto 4: (R)-4-(3-metoxipropilsulfonil)-7-ciano-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-1H-1,4-benzodiazepina, sal clorhidrato (Referencia)

35 Compuesto 5: (R)-4-[(5-bromo-2-tienil)sulfonil]-7-ciano-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-1H-1,4-benzodiazepina, sal clorhidrato (Referencia)

Compuesto 6: (R)-7-ciano-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(1-piperidinilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina, sal clorhidrato (Referencia)

Compuesto 7: (R)-7-ciano-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-4-[(4-metoxifenil)sulfonil]-3-(fenilmetil)-1H-1,4-benzodiazepina, sal clorhidrato (Referencia)

45 Compuesto 8: 4-(3-bromofenilamino)-6,7-bis(metoxi) quinazolina

Compuesto 9: N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidincarboxamida

50 *Administración de los Fármacos*

Para la administración del Compuesto 1 (una epotilona) a roedores, se han usado dos excipientes diferentes: (1) etanol/agua (1:9, v/v) y (2) Cremophor®/etanol/agua (1:1:8, v/v). El compuesto 1 se disolvió en primer lugar en etanol o en una mezcla de Cremophor®/etanol (50:50). La dilución final a la potencia de dosificación requerida se hace menos de 1 h antes de la administración del fármaco. Para la administración parenteral (IV), la dilución se hizo con agua de manera que las soluciones de dosificación contenían la composición del excipiente especificado descrita anteriormente. Para administración oral (PO), la dilución se hizo con tampón fosfato sódico 0,25 M (pH = 8,0) a una proporción de 30/70, v/v. El paclitaxel se disolvió en una mezcla 50/50 de etanol y Cremophor® y se almacenó a 4°C; la dilución final de paclitaxel se obtuvo inmediatamente antes de la administración del fármaco con NaCl al 0,9%. El volumen de todos los compuestos inyectados era de 0,01 ml/g de ratones, y 0,005 mUg de ratas.

Ensayo de formación de una colonia de células clonogénicas

65 La potencia con la que los compuestos destruyen las células tumorales clonogénica (células que son capaces de dividirse indefinidamente para formar una colonia) *in vitro* se evaluó mediante el ensayo clonogénico. Al final de una exposición de 16 h al fármaco, los cultivos de monocapa celular se disociaron por exposición de las células a tripsina al 0,05% durante 5 min a 37°C. Las células se resuspendieron en medios completos (que contenían FBS al 10%), se contaron con un Coulter Channelyzer, se diluyeron y se sembraron en placas con 5 réplicas por cada dilución, en

ES 2 325 055 T3

placas petri de cultivo tisular de plástico. Las células se incubaron en una atmósfera humidificada durante 10 días a 37°C. Las colonias celulares se tiñeron con violeta de cristal y aquellas con >50 células por colonia se registraron. Se determinó la concentración requerida para destruir las células clonogénicas de carcinoma de colon humano HCT-116 en un 90% (es decir, la CI90).

5

Marcado con BrdUrd de tumores que crecen asincrónicamente

Se disolvió BrdUrd en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS), pH 7,4, y se administró por infusión prolongada (24 h) a través de la vena de la cola a ratones a una dosis de 100 mpk. Los ratones que llevan tumor se sacrificaron al final del periodo de infusión y los tumores se extirparon para análisis de BrdUrd/ADN.

10

Dispersión del tumor y tinción de las células

Los tumores se extirparon y se picaron con unas tijeras, y se disociaron usando un cóctel enzimático constituido por 15 colagenasa al 0,025% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), pronasa al 0,05% (Calbiochem LaJolla, CA) y ADNasa al 0,04% (Sigma) durante 1 h a 37°C. Después de retirar los desechos, haciendo pasar las suspensiones celulares a través de tamices de nylon de 70 µm, las células se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en metanol al 75%. Las células fijadas se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su análisis.

20 En el día del ensayo, las células fijadas en metanol al 75% se lavaron una vez en PBS, se resuspendieron en pepsina en HCl 2 N (0,2 mg/ml) y se incubaron durante 20 min a 37°C. Las células se lavaron después dos veces con 1 ml de PBS que contenía 0,5% de suero bovino fetal (FBS) y Tween 80 al 0,5%. Después de los dos lavados, las células se resuspendieron en 1 ml de PBS que contenía FBS al 2% y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Las células se centrifugaron después y los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de anti-BrdUrd-FITC (10 25 µg/ml) (Boeringer Mannheim). Después de un periodo de incubación de 45 min, las células se lavaron en 1 ml de PBS que contenía FBS al 0,5% y Tween 80 al 0,5%. Las células lavadas se resuspendieron en 1 ml de ARNasa (1 mg/ml) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió yoduro de propidio (Sigma) a una concentración de 10 µg/ml en PBS.

30

Ensayo Antitumoral In Vivo

Los xenoinjertos de tumor humano se mantuvieron en ratones desnudos Balb/c nu/nu. Los tumores se propagaron en forma de transplantes subcutáneos en la cepa de ratón apropiada usando fragmentos de tumor obtenidos a partir de ratones donantes.

35

El número de animales requerido necesarios para detectar una respuesta significativa (6-10) se combinó al comienzo del experimento y a cada uno se le proporcionó un implante subcutáneo de un fragmento de tumor (~50 mg) con un trocar de calibre 13. Para el tratamiento de tumores en fase temprana, los animales se combinaron de nuevo antes de la distribución a los diversos grupos de tratamiento y control. Para el tratamiento de los animales 40 con enfermedad en una fase avanzada, se permitió que los tumores crecieran hasta el intervalo de tamaño predeterminado (los tumores fuera del intervalo se excluyeron) y los animales se distribuyeron uniformemente en diversos grupos de tratamiento y control. El tratamiento de cada animal se basó en el peso corporal individual. Los animales tratados se comprobaron diariamente para la toxicidad/mortalidad relacionadas con el tratamiento. Cada grupo de animales se pesó antes de iniciarse el tratamiento (Peso1) y después de nuevo después de la última dosis de tratamiento 45 (Peso2). La diferencia de peso corporal (Peso2-Peso1) proporcionó una medida de la toxicidad relacionada con el tratamiento.

La respuesta del tumor se determinó por medición de los tumores con un calibre dos veces a la semana hasta que los tumores alcanzaron un tamaño “diana” predeterminado de 0,5 o 1,0 g. Los pesos del tumor (mg) se estimaron a 50 partir de la fórmula:

$$\text{Peso del tumor} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2) \div 2$$

55 La dosis máxima tolerada (DMT) se define como el nivel de dosis inmediatamente por encima del cual ocurre una toxicidad excesiva (es decir, más de una muerte). La DMT con frecuencia era equivalente a la dosis óptima (DO). La actividad se describe a la DO. Los ratones tratados que morían antes de que sus tumores hubieran alcanzado el tamaño diana se consideró que habían muerto por toxicidad del fármaco. No murieron ratones de control que portaran tumores menores del tamaño diana. Se consideró que los grupos de tratamiento con más de una muerte causada por la toxicidad del fármaco habían tenido tratamientos excesivamente tóxicos y sus datos no se incluyeron en la evaluación de la eficacia antitumoral de un compuesto.

60 El criterio de valoración de la respuesta del tumor se expresó en términos de retraso del crecimiento del tumor (valor T-C), definido como la diferencia en el tiempo (días) requerido para que los tumores tratados (T) alcanzaran el tamaño diana comparado con los del grupo de control (C).

ES 2 325 055 T3

Para estimar la destrucción de las células tumorales, el tiempo necesario para doblar el volumen del tumor (TVDT) se calculó en primer lugar con la fórmula:

$$5 \quad TVDT = \frac{\text{Tiempo medio (días) para que los tumores de control alcancen el tamaño diana}}{\text{Tiempo medio (días) para que los tumores de control alcancen la mitad del tamaño diana}}$$

Y,

$$10 \quad \text{Log destrucción de células (LCK)} = \frac{T-C}{(3,32 \times TVDT)}$$

15 Un tumor se define como "curado" cuando no hay una enfermedad detectable en el momento de la terminación del estudio (Día >75 días después del implante del tumor); el intervalo entre la terminación del estudio y el final del tratamiento con el fármaco siempre supera 10 veces el tiempo para doblar el volumen de cualquier tipo particular de tumor.

20 Los tamaños de grupo típicamente consistían en ocho ratones en todos los grupos de tratamiento y control. Los análisis estadísticos de los datos de respuesta se realizaron usando el ensayo de Wilcoxon generalizado de Gehan.

Ejemplo 1

Tumores que comprenden poblaciones de células tanto proliferativas como no proliferativas

25 A medida que un tumor crece, el desarrollo vascular a menudo no puede mantener el ritmo de la rápida proliferación de la población de las células malignas. En consecuencia, las masas de tumor sólido típicamente presentan redes anormales de vasos sanguíneos que, a diferencia de los vasos en los tejidos normales, fallan a la hora de proporcionar un soporte nutricional adecuado a las células tumorales para un crecimiento óptimo. Los tumores sólidos, por lo tanto, comprenden células tumorales tanto proliferativa como no proliferativas. En la mayoría de los tumores sólidos, las células tumorales no proliferativas constituyen la mayoría de la población total de células tumorales. Los agentes anti-cancerosos actuales dirigen los procedimientos bioquímicos de las células proliferativas. Las poblaciones de células tumorales no proliferativa y/o células estacionarias se van afectadas solo mínimamente por dichos agentes. De esta manera un factor contributivo principal al fallo de la radiación o la quimioterapia para curar 35 la enfermedad neoplásica es la incapacidad de estos compuestos para dirigirse a la población de células tumorales quiescentes.

40 En el xenoinjerto de carcinoma de colon humano HCT116, usando un régimen de BrdUrd infusional prolongado (24 h), se estimó que la fracción de células proliferativas en diversos tumores *in vivo* constituye sólo una fracción minoritaria de la población de células totales. En un tumor HCT-116 de 200-300 mg sólo aproximadamente el 20% de la población de células contenía células proliferativas mientras que el 80% restante contenía células no proliferativas (Figura 1). Se ha examinado también un gran número de otros tumores y en cada caso las células no proliferativas constituyen la mayoría de las células presentes en el tumor (Tabla 2).

45

TABLA 2

Tumor	Histología	Tamaño del Tumor (mg)	% Proliferativas	% No proliferativas
HCT116	Cá. de colon	200-300	20	80
San1	Cá. de células escamosas	200-300	41	59
MDA-Pca-2b	Cá. de próstata	200-300	35	65
Pat-21	Cá. de mama	200-300	31	69
San1	Cá. de células escamosas	200-300	44	56

ES 2 325 055 T3

El micro-entorno limitado por nutrientes de un tumor sólido puede resumirse en el cultivo celular *in vitro* controlando las condiciones de crecimiento de los medios de cultivo. De esta manera, agotando el suministro de nutrientes (Día 8 del cultivo) las células tumorales pueden inducirse a un estado no proliferativo o quiescente (fase estacionaria, aproximadamente un 90% no proliferativa), mientras que en condiciones óptimas de nutrientes (Día 3 del cultivo), prácticamente todas las células tumorales proliferan exponencialmente (fase logarítmica, aproximadamente un 90% proliferativa).

Ejemplo 2

10 Las composiciones usadas en la invención destruyen selectivamente las células tumorales no proliferativas

La potencia con la que el Compuesto 2 destruye las células tumorales clonogénicas (células que son capaces de dividirse indefinidamente para formar una colonia) *in vitro* se evaluó mediante el ensayo clonogénico. Al final de una exposición de 16 h al fármaco, los cultivos de monocapa celular se disociaron por exposición de las células a tripsina al 0,05% durante 5 min a 37°C. Las células se resuspendieron en medios completos (que contenían FBS al 10%), se contaron con un Coulter Channelyzer, se diluyeron y se sembraron en placas con 5 réplicas por cada dilución, en placas petri de cultivo tisular de plástico. Las células se incubaron en una atmósfera humidificada durante 10 días a 37°C. Las colonias celulares se tiñeron con violeta de cristal y aquellas con >50 células por colonia se registraron. Se determinó la concentración necesaria para destruir las células clonogénicas de carcinoma de colon humano HCT-116 en un 90% (es decir, la CI90).

El Compuesto 2 y sus análogos destruyen selectivamente las células no proliferativas (estacionarias) del carcinoma de colon humano HCT116 comparado con las células proliferativa (Log) (Figuras 2-4 y Tabla 3). El grado de diferencia (veces) en la sensibilidad entre la población proliferativa y no proliferativa variaba del 2,7-181.

TABLA 3

30		CI ₉₀ (μ M)		Proporción de selectividad de células no proliferativas (veces)
		Estacionario	Log	
35	Compuesto 3	0,36	65	181,0
40	Compuesto 4	1,05	91,2	86,9
45	Compuesto 5	1,08	84,7	78,4
	Compuesto 6	1,04	66,8	64,2
	Compuesto 2	0,96	36,7	44,2
	Compuesto 7	9,6	26	2,7

50 La mayoría de fármacos anti-cáncer trabajan afectando a la síntesis del ADN o a su funcionamiento y, por lo tanto, se dirigen a las células proliferativas dejando las células quiescentes intactas a menos que dichas células se dividan pronto después de la exposición al fármaco. En consecuencia, la eficacia de los fármacos anti-cáncer a menudo está limitada por esta fracción refractaria de células tumorales. Por ejemplo, en contraste directo con el Compuesto 2, usado habitualmente en agentes para el cáncer tales como paclitaxel, epotilona B y 5-flourouracilo son preferentemente citotóxicos para las células proliferativas tumorales y esencialmente ineficaces contra las células no proliferativas (Figuras 5 y 6, y Tabla 4).

60

65

TABLA 4

Compuesto	CI ₉₀		Proporción de selectividad de células no proliferativas (veces)
	Estacionario	Log	
Paclitaxel	>162 nM	17,8 nM	<0,1
Epotilona B	>108 nM	1,3 nM	<0,01
5-Fluorouracilo	4,6 µg/ml	>162 µg/ml	<0,03

Ejemplo 3

Los agentes (1) en combinación con el compuesto (2) actúan sinéricamente para destruir las células tumorales *in vitro*

Como se ha analizado anteriormente, los estudios mecanísticos sugerían firmemente que el Compuesto 2 es selectivamente citotóxico para las células tumorales no proliferativas. Esta característica excepcional eleva las perspectivas de la terapia combinada sinérgica con los fármacos anti-cáncer existentes que se dirigen fundamentalmente a células proliferativas tumorales. Por ejemplo, el paclitaxel era altamente citotóxico para las células HCT-116 en fase log *in vitro* produciendo un valor de CI₉₀ de 17,8 nM (Figura 5). Sin embargo, contra la población de células estacionarias no proliferativas, era completamente no tóxico a concentraciones tal altas como 162 nM (Figura 5). Se observó una diferencia drástica similar con epotilona B (Figura 6) con CI₉₀ de 1,3 y >108 nM para células proliferativas y no proliferativas, respectivamente (Tabla 3). *In vitro*, la combinación de paclitaxel con el Compuesto 2 produjo citotoxicidad sinérgica de manera que la combinación produjo una destrucción de células más que aditiva (Figura 7). Además, se descubrió que para observar esta combinación sinérgica, los dos agentes deberían administrarse en una secuencia específica. Se observó sinergia cuando las células se trataron con los dos agentes simultáneamente o cuando paclitaxel precedía al Compuesto 2. Cuando el Compuesto 2 se administró 24 h antes que paclitaxel, se observó antagonismo.

Se observaron una sinergia y secuencia similares con una combinación del Compuesto 2 y el Compuesto 1 (Figuras 8-10).

Ejemplo 4

Los agentes (1) junto con el compuesto (2) actúan sinéricamente para destruir las células tumorales en xenoinjertos de tumor humano

La terapia combinada infundiendo el Compuesto 2 más paclitaxel en embolada iv se realizó usando el modelo de tumor sc HCT-116 (Figura 11). Aunque los agentes individuales administrados en solitario eran inactivos (0,4 y 0,6 LCK para el Compuesto 2 y paclitaxel, respectivamente), la combinación (Compuesto 2,125 mpk 24 h de infusión iv más paclitaxel, 24 mg/kg iv) produjo 1,8 LCK, un efecto sinérgico.

La quimioterapia combinada con el Compuesto 2 y paclitaxel administrados como administración en embolada demostró también sinergia en las células Pat-7 de carcinoma de ovario humano procedentes de un paciente con cáncer que desarrolló resistencia a TAXOL®. Paclitaxel y el Compuesto 2 administrados a sus dosis máximas toleradas respectivas, produjeron menos de 1 unidad logarítmica de destrucción celular (LCK) de respuesta del tumor en este modelo de tumor resistente como tratamientos con un solo agente. Sin embargo, la combinación del Compuesto 2 y paclitaxel a las dosis máximas toleradas produjo sinergia terapéutica y actividad antitumoral significativa de 1,7 LCK (Figura 12). La actividad antitumoral sinérgica se observó también en xenoinjertos de carcinoma de colon humano HCT116 (Figura 13). Se demostró que el compuesto 2, a niveles de dosis que producían una exposición sistémica similar a la observada en pacientes humanos (20-80 µM.h), sinergizaba con la acción antitumoral de paclitaxel.

La sinergia terapéutica se demostró también claramente con la combinación del Compuesto 1 y el Compuesto 2 *in vivo* en los xenoinjertos de carcinoma de colon humano HCT/VM46 resistente a multi-fármacos. Tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 tienen una actividad antitumoral moderada en este modelo como un tratamiento con un solo agente (Figura 13). Ambos agentes provocaban más de 1 LCK de respuesta del tumor (1,6 y 1,1 LCK, respectivamente) pero no inducían la curación del tumor. Sin embargo, cuando los dos agentes se administraron en combinación (Compuesto 1 seguido 24 h después del Compuesto 2), se observó una mejora drástica en la actividad antitumoral.

ES 2 325 055 T3

En particular, se observaron un aumento altamente significativo en el retraso del crecimiento del tumor (3,7 LCK) incluyendo efectos curativos potenciados en 3 de cada 7 ratones (Figura 13).

Se demostró la dependencia de la secuencia de la combinación. Cuando el tratamiento con el Compuesto 2 se administró 24 h antes que con el Compuesto 1, no se observó sinergia terapéutica (Figura 14), comportándose la combinación como cuando el Compuesto 1 se administraba en solitario.

Ejemplo 5

El Compuesto (2) potencia la actividad antitumoral *in vivo* del inhibidor de topoisomerasa I CPT-11 frente a carcinoma sólido humano

CPT-11 es un agente anticanceroso citotóxico antiproliferativo que interacciona específicamente con la enzima topoisomerasa I que alivia la tensión torsional en el ADN induciendo roturas reversibles en la cadena sencilla. La citotoxicidad de CPT-11 se debe al daño en el ADN de doble cadena producido durante la síntesis del ADN cuando las enzimas de replicación interactúan con el complejo ternario formado por topoisomerasa I-ADN, y CPT-11 o su metabolito activo SN-38. De esta manera, CPT-11 se dirige selectivamente contra las células proliferativas que experimentan síntesis activa del ADN. Se ha demostrado en este ejemplo que el tratamiento combinado de ratones con un xenoinjerto de carcinoma de colon humano HCT116 avanzado (300-500 mg) con CPT-11 una hora antes que el Compuesto 2 produjo actividades antitumorales sinérgicas que eran muchos superiores que las de cada uno de los agentes administrados individualmente (Figuras 15A y 15B). En este estudio, se administró CPT-11 por IV a o casi a su DMT de 30 mg/kg/iny. El compuesto 2 se administró a dos niveles de dosis diferentes: 60 y 80 mg/kg/iny, por IV. Estas dosis del Compuesto 2 se eligieron porque producían exposiciones de fármaco que se aproximaban a la exposición que podía conseguirse clínicamente. Como se muestra en las Figuras 15A y 15B, ambos niveles de dosis del Compuesto 2 cuando se combinaba con CPT-11 producían una actividad antitumoral significativamente mayor que cada uno de los agentes administrado individualmente. Además, la combinación producía una regresión parcial y completa del ritmo del tumor significativamente mayor que los agentes individuales en solitario.

TABLA 5

Actividad antitumoral de la quimioterapia combinada con el compuesto 2 y CPT-11 contra carcinoma de colon humano HCT116 avanzado

Tratamiento con Fármaco ¹	Dosis (mg/kg/iny)	Respuesta del Tumor ²		
		LCK ³	RP (%) ⁴	RC (%) ⁵
CPT-11	30	1,5	50	0
Compuesto 2	80	1,0	25	0
	60	0,6	0	0
CPT-11 + Compuesto 2	30 + 80	>3,0	100	88
CPT-11 + Compuesto 2	30 + 60	>3,0	100	62

¹ El régimen de tratamiento con el fármaco era por IV, Q2D x 5, CPT-22 administrado 1 hora antes que el Compuesto 2
² Los tumores estaban en el intervalo de 300-500 (media ~ 200 mg) en el momento de iniciarse el tratamiento
³ LCK = unidades logarítmicas de destrucción celular

⁴ RP = Respuesta parcial, una reducción en el tamaño del tumor del 50% o mayor.

⁵ RC = Respuesta completa, definida como la erradicación por tratamiento de todos los tumores medibles fácilmente. Un tumor se define como inmedible cuando es menor de 35 mg. Una respuesta completa difiere de una curación en que pueden permanecer tumores microscópicos u ocultos que pueden conducir al progreso posterior del tumor.

¹⁵ Ejemplo 6

El Compuesto (2) potencia la actividad antitumoral in vivo de Gemcitabina (GEMZAR) frente a tumores humanos sólidos

²⁰ Gemcitabina es un agente quimioterapéutico citotóxico antiproliferativo de tipo antimetabolito que presenta especificidad por la fase celular. El agente destruye principalmente células que están experimentando síntesis de ADN (fase S) y también bloquea el progreso de las células a través del límite de la fase G1/S. De esta manera, gemcitabina es selectivamente tóxico contra las células que se están dividiendo activamente o proliferativas. Se ha demostrado que la combinación de gemcitabina con el compuesto 2 (gemcitabina se administró 1 hora antes que el Compuesto 2) produjo una actividad antitumoral potenciada contra xenoinjertos de carcinoma de colon humano avanzado HT-29 en ratones desnudos (Figura 16 A y 16B). Significativamente, se observó una actividad antitumoral potenciada no sólo en términos de retraso del crecimiento (LCK) sino lo que es más importante, dio como resultado también una mejora pronunciada en la velocidad de respuesta (regresión del tumor). De esta manera, la combinación del Compuesto 2 con Gemcitabina produjo una RP del 100% en todos los ratones tratados mientras que el compuesto 2 como agente único produjo una RP del 12,5% y gemcitabina como agente único produjo una velocidad de respuesta del 0 y 25% respectivamente a una dosis de 24 y 6 mg/kg/iny. (Figura 16B).

³⁵ Ejemplo 7

Paclitaxel junto con el compuesto (2) actúa sinéricamente para destruir un xenoinjerto de cáncer de colon humano

⁴⁰ Paclitaxel destruye las células tumorales a medida que entran en la fase mitótica del ciclo de la división celular. De esta manera, paclitaxel es selectivamente tóxico contra las células proliferativas (Figura 5). Hemos demostrado que la combinación del Compuesto 2 con paclitaxel producía una actividad antitumoral sinética contra un modelo de carcinoma de colon humano, HCT116, en ratones desnudos. Las Figuras 17A y 17B muestran que la administración iv de 40 o 80 mpk del Compuesto 2 tres horas después de la administración iv de paclitaxel (20 mpk, semanalmente x 4) producía una potenciación drástica del efecto antitumoral de cualquiera de los agentes en solitario; la extensión de la ganancia terapéutica excedía claramente la que resultaría si los dos agentes estuvieran ejerciendo simplemente una actividad antitumoral aditiva. Esta interacción sinética puede observarse no sólo sobre el retraso del crecimiento del tumor, sino también en términos de las medidas más pertinentes clínicamente de la respuesta del tumor, en concreto, la regresión parcial y completa del tumor (o la respuesta, RP y RC, respectivamente) y en las curaciones del tumor. Esto se ilustra en la Tabla 6 y en la Figura 17C.

⁵⁰

(Tabla pasa a página siguiente)

⁵⁵

⁶⁰

⁶⁵

TABLA 6

Antitumor de quimioterapia combinada con el compuesto 2 y paclitaxel frente al avance del carcinoma de colon humano HCT116

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Tratamiento con Fármaco ¹	Dosis (mg/kg/iny)	Respuesta del Tumor ²			
		LCK ³	RP (%) ⁴	RC (%) ⁵	Curaciones (%) ⁶
Paclitaxel	20	2,5	20	0	0
Compuesto 2	80	1,1	0	0	0
Compuesto 2	40	0,3	0	0	0
Paclitaxel compuesto 2	+ 20 + 80	> 3,3	0	100	60
Paclitaxel compuesto 2	+ 20 + 40	> 3,3	40	30	30

¹ El régimen de tratamiento con el fármaco era por IV, Q7D x 4. Paclitaxel se administró 3 horas antes que el Compuesto 2

² Los tumores estaban en el intervalo de 130-300 (media ~ 200 mg) en el momento de iniciarse el tratamiento

³ LCK = unidades logarítmicas de destrucción celular

⁴ RP = Respuesta parcial, una reducción en el tamaño del tumor del 50% o mayor.

⁵ RC = Respuesta completa, definida como la erradicación por tratamiento de todos los tumores medibles fácilmente. Un tumor se define como inmedible cuando es menor de 35 mg. Una respuesta completa difiere de una curación en que pueden permanecer tumores microscópicos u ocultos que pueden conducir al progreso posterior del tumor

⁶ Curación - sin evidencias de una enfermedad viable en el Día 77 después del implante del tumor según se determinó mediante autopsia.

Ejemplo 8

50

*Los inhibidores de Her-1 (Compuesto 8) junto con el compuesto (2) actúan sinérgicamente para destruir las células cancerosas SAL-2 *in vitro* y las células escamosas de carcinoma A431 *in vivo**

55

60

65

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF, o Her-1) se ha visto implicado en muchos carcinomas humanos epiteliales y de células escamosas. La unión de EGF a sus receptores en células tumorales conduce a la activación de la actividad de la proteína tirosina quinasa y la autofosforilación de tirosina. Estos acontecimientos a su vez conducen a la activación de una cascada de respuestas bioquímicas que están implicadas en la transducción de señales mitogénicas (proliferativas) de las células cancerosas. La inhibición de la unión del receptor de EGF se ha mostrado en las células sensibles a conducir a la inhibición de la proliferación celular, la detención del ciclo celular y apoptosis. De esta manera, los inhibidores de EGF o Her-1 se dirigen selectivamente a células proliferativas e, interfiriendo con la transducción de señales mitogénica, hacen a las células cancerosas no proliferativas. Dada la selectividad del compuesto (2) que se dirige a las células no proliferativas, se propone el concepto de que podemos beneficiarnos de este modo de acción particular de los inhibidores de Her-1, que conduciendo las células cancerosas a un estado no proliferativo las "sensibilizaría" a la actividad pro-apoptótica de los compuestos 2. Esta hipótesis resultó ser verdadera en condiciones experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, para evaluar la eficacia terapéutica de combinar un inhibidor de Her-1 con el compuesto 2, se realizaron experimentos utilizando las células tumorales SAL-2 que sobreexpresan constitutivamente la forma activada de los receptores Her-1. Para este fin, se

usó un inhibidor de Her-1, el Compuesto 8. Como referencia, se usó paclitaxel como un ejemplo de los agentes que se dirigen sólo a las células proliferativas y, de acuerdo con nuestra hipótesis, no funcionaría bien en las presentes condiciones experimentales, es decir, exposición secuencial del fármaco: inhibidor de Her-1 antes de inducir la estasis celular, seguido del Compuesto 2 o paclitaxel. Los datos ponen de manifiesto que las células cancerosas SAL2 que crecen exponencialmente eran relativamente resistentes al Compuesto 2 y paclitaxel cuando cada uno se administró como un agente individual, como se muestra en las Figuras 18A-18G. La combinación secuencial de inhibidor de Her-1 '832 seguido de paclitaxel era antagonista tal y como predecía nuestra hipótesis (Figura 18C). En contraste, la combinación secuencial del inhibidor de Her-1 (Compuesto 8) seguido del Compuesto 2 era sinérgica (Figura 18D).

Para demostrar los efectos de combinar un inhibidor de Her-1 con el compuesto (2) *in vivo*, se empleó el inhibidor de Her-1 Iressa® junto con el Compuesto 2 contra el carcinoma de células escamosas humanas, A431, que se sabe que sobreexpresa el receptor de Her-1. Como se muestra en las Figuras 18E y F, dos niveles de dosis diferentes del Compuesto 2 cuando se usa junto con Iressa®, producían una actividad antitumoral potenciada al compararlo con cada uno de los agentes administrado en solitario. Debe observarse que Iressa se administró en un régimen de tratamiento diario, Q1D x 11, tratamiento que se inició 3 días antes de iniciarse el tratamiento con el Compuesto 2. El Compuesto 2 se administró en un programa Q2D x 5. Es importante destacar que este régimen de tratamiento secuencial con el fármaco (es decir, Iressa® en primer lugar) funcionaba mal con paclitaxel (Figura 18G). La combinación de Iressa® y paclitaxel producía efectos antitumorales que no eran mejores que los de cualquiera de los agentes individuales usados en solitario.

20

Ejemplo 9 (Referencia)

La combinación del Compuesto 2 con un anticuerpo de Herceptina dirigido por Her-2 producía efectos inhibitorios sinérgicos sobre el crecimiento de las células de cáncer de mama humanas que sobreexpresan Her-2

El proto-oncogén de HER-2 (o c-erbB2) codifica una proteína receptora transmembrana de 185 kDa, que está relacionada estructuralmente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico, o Her-1. La sobreexpresión de la proteína HER2 se observa en el 25%-30% de cánceres de mama primarios. Herceptin® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular de la proteína Her-2. Se ha demostrado que Herceptin®, en ensayos tanto *in vitro* como en animales, inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan Her-2. De esta manera, de acuerdo con el concepto propuesto en esta invención, Herceptin® es un ejemplo de una clase de agentes que actúan haciendo a las células cancerosas no proliferativas, sensibilizando de esta manera a las células tumorales a la acción anticancerosa del compuesto (2), que se dirige selectivamente a las células no proliferativas. De esta manera, en este ejemplo, el pretratamiento de la línea celular humana de cáncer de mama BT-474, que sobreexpresa Her-2, durante 2 días antes del tratamiento con el Compuesto 2 producía efectos antiproliferativos sinérgicos sobre el crecimiento de las células cancerosas (Figura 19).

40 Ejemplo 10

Tamoxifeno en combinación con el compuesto (2) actúa sinérgicamente para destruir las células cancerosas en un xenoinjerto de cáncer de mama humano dependiente de estrógeno

La mayoría de los cánceres de mama humanos requieren estrógeno para el crecimiento y progreso del tumor (dependiente de estrógeno). El tratamiento de cánceres de mama dependientes de estrógeno con antiestrógenos, tales como tamoxifeno, se ha demostrado que inhibe la proliferación celular del tumor tanto *in vitro* como *in vivo*. Para evaluar la eficacia de los agentes anti-cancerosos combinados usados en la invención en un modelo de cáncer de mama humano, se desarrollaron xenoinjertos MCF-7 en ratones desnudos y se trataron como se ha descrito en este documento. La combinación quimioterapia usando el Compuesto 2 y tamoxifeno dio como resultado una actividad antitumoral potenciada. De hecho, se observó la remisión del tumor en 3 de cada 8 ratones en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MCF-7. La Figura 20 muestra que el Compuesto 2 administrado como un agente individual sólo producía un efecto muy moderado sobre el crecimiento del tumor. Tamoxifeno solo era notablemente más activo en este modelo, aproximadamente tan eficaz como la retirada de gránulos de estradiol, pero aún así después del tratamiento con tamoxifeno, o de la retirada de los gránulos, todos los tumores volvieron a crecer y no se observaron curaciones. En contraste, 40 mpk de tamoxifeno junto con el Compuesto 2 (po, 100 mpk, qdx10, dos ciclos) dio como resultado una disminución drástica en el peso medio del tumor, además de las curaciones mencionadas anteriormente.

60 Ejemplo 11

La terapia de ablación por andrógenos (quirúrgica o química) potencia la sensibilidad del cáncer de próstata humano dependiente de andrógenos al Compuesto 2 induciendo un estado no proliferativo en las células tumorales (quiescencia)

Como se ha mencionado anteriormente, las células se hacen no proliferativas o "quiescentes" en diversas condiciones biológicas. Un procedimiento convencional para el tratamiento del cáncer de próstata humano es la castración química. Aunque la invención no depende de ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que en un cáncer de

ES 2 325 055 T3

próstata dependiente de andrógenos, la ablación de la hormona actúa como un agente pro-quiescencia retirando los estímulos al crecimiento críticos para la proliferación del tumor. La eficacia de los agentes anti-cáncerosos usados en la invención, por lo tanto, se evaluó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano.

5 En el modelo de xenoinjerto de carcinoma de próstata humano sc MDA-Pca-2b dependiente de andrógenos, el tratamiento con el Compuesto 2 solo (400 mpk, po, q1dx10) tenía un efecto moderado sobre el crecimiento del tumor, como se muestra en la Figura 21. La terapia de ablación por andrógenos (castración quirúrgica) reducía también la velocidad de crecimiento del tumor, pero no provocaba regresión. Como revelan los datos (Figura 21) la administración del Compuesto 2 tres días después de la castración daba como resultado una rápida regresión del tumor.

10 Otro procedimiento de hacer no proliferativas a las células de carcinoma de próstata dependiente de andrógenos es el uso de agentes químicos anti-androgénicos, tales como Casodex®. De hecho, ahora se sabe que algunos carcinomas de próstata permanecen sensibles a la terapia con Casodex® incluso después de hacerse cada vez más independientes de andrógenos, y viceversa. Se ha planteado la hipótesis de que este fenómeno resulta de mutaciones específicas en el receptor de andrógenos que afectan diferencialmente a la unión del receptor de andrógenos y de anti-andrógenos. Para ensayar la eficacia antitumoral de combinar Casodex® y el Compuesto 2, se empleó el modelo de cáncer de próstata humano Pca-2b-Al sensible a Casodex® pero independiente de andrógenos. Como se muestra en la Figura 22, los efectos combinados de Casodex® y el Compuesto 2 fueron significativamente mayores en este modelo de tumor que los efectos de cualquiera de los agentes usados en solitario, administrándose ambos a sus dosis y régimen máximos tolerados (600 mpk, po, q1D x10 para el Compuesto 2; 150 mpk, po, q1D x 4 para Casodex®, respectivamente). De esta manera, por definición, la combinación de Casodex® y el Compuesto 2 producía una actividad antitumoral sinérgica que superaba el de cada uno de los agentes administrados individualmente.

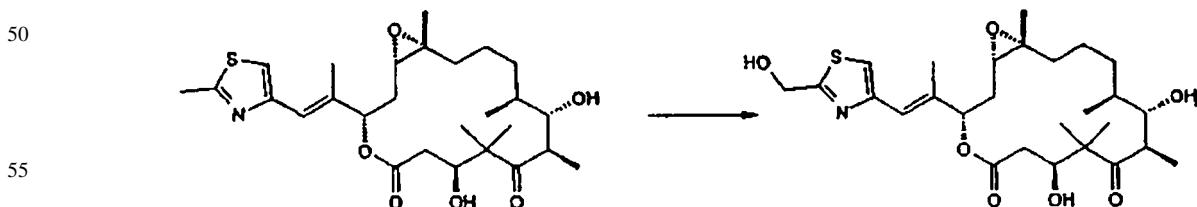
25 Ejemplo 12

El Compuesto 2 junto con un inhibidor de cdk (Compuesto 9) producía efectos sinérgicos sobre la destrucción celular de una manera estrictamente dependiente de la secuencia (Figura 23)

30 La división mitótica de las células de mamífero requiere las actividades coordinadas de una familia de proteínas quinasas serina/treonina, conocidas como las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Se ha mostrado que los inhibidores de CDK, específicamente CDK2, inhiben la proliferación celular y detienen las células en el límite G1/S del ciclo celular. Para determinar los efectos de la quimioterapia combinada con el inhibidor de CDK (CDKI) y el compuesto (2), se realizó un estudio mediante el cual se trataron células de carcinoma de ovario humano A2780s 35 exponencialmente proliferativas durante un periodo de 4 horas con 1,5 μ M de un inhibidor selectivo de CDK2. El compuesto 9 (dosis sin efecto) se combinó con un tratamiento de 20 horas de concentraciones de Compuesto 2 en aumento. Se emplearon dos secuencias de tratamiento: (1) el Compuesto 9 durante 4 horas seguido del Compuesto 2 durante 20 horas, o (2) el Compuesto 2 durante 20 horas seguido del Compuesto 9 durante 4 horas. Como se muestra en la Figura 23, se observó una destrucción celular sinérgica cuando el CDKI se administraba en primer lugar, mientras que no se observaron efectos cuando el Compuesto 2 se administraba en primer lugar. Esto soporta la hipótesis de que administrando el CDKI en primer lugar, se células se hacían no proliferativas, lo que a su vez las sensibilizaba a la acción citotóxica del Compuesto 2.

45 Ejemplo 13 (Referencia)

Conversión de Epotilona B en Epotilona F



60 (i) Se pusieron 1,98 g (3,90 mmol) de Epotilona B en una atmósfera de argón y se disolvieron en 60 ml de CH_2Cl_2 seco. A esta solución se le añadieron 0,720 g de mCPBA (4,17 mmol, 1,07 equivalentes). La mezcla se dejó en agitación a 25°C durante 5,5 horas. La mezcla de reacción se inactivó con 60 ml de NaHCO_3 , y se extrajo con 3 x 75 ml de CHCl_3 . La fase orgánica se lavó con 100 ml de agua seguido de 70 ml de Na_2SO_4 (ac.) al 5% y después 70 ml salmuera. La fase orgánica se secó después sobre Na_2SO_4 . El producto bruto de reacción se cromatógrafió usando gel de sílice eluyendo con MeOH al 2% en CHCl_3 para producir 0,976 g del N-óxido (48%) en forma de un sólido esponjoso blanco.

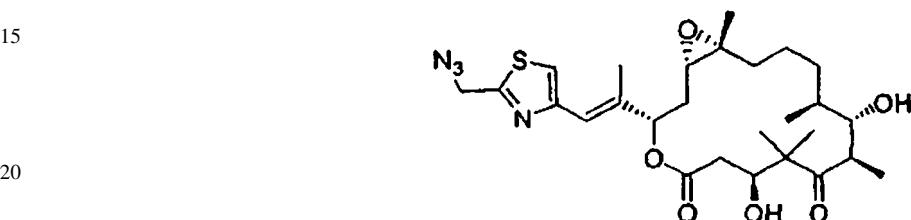
65 (ii) A un tubo re-sellable en una atmósfera de argón se le añadieron 0,976 g del N-óxido (1,86 mmol) disueltos en 35 ml de CH_2Cl_2 seco, 2,6-lutidina (1,73 ml, 14,88 mmol, 8 equivalentes) y $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ (1,84 ml, 13,02 mmol,

ES 2 325 055 T3

7 equivalentes). El tubo se cerró herméticamente y se calentó a 70°C durante 25 min. La mezcla se dejó enfriar y el disolvente se retiró bajo una corriente de argón, seguido de concentración hasta unos pocos ml de una solución de color amarillo oscuro al vacío. La reacción se diluyó con 25 ml de MeOH y se añadieron 2,9 ml de NH₄OH (ac.) al 28%. La mezcla se calentó a 45°C durante 20 min, después se enfrió a temperatura ambiente. El producto bruto se concentró en el evaporador rotatorio y se cromatógrafió usando gel de sílice eluyendo con MeOH al 4% en CHCl₃ para producir 0,815 g de Epotilona F (84%).

Ejemplo 14 (Referencia)

Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]-[2-[2-(Azidometil)-4-tiazolil]-1-metiletenil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4,17-dioxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona



A una solución agitada de epotilona F del Ejemplo 13 anterior (957 mg, 1,83 mmol) en 20,0 ml de tetrahidrofurano a 0°C en una atmósfera de argón se añadieron 0,47 ml de difenilfosforil azida (604 mg, 2,19 mmol, 1,2 equivalentes). La mezcla se agitó durante aproximadamente 3 min. Después se añadió 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (0,27 ml, 278 mg, 1,83 mmol, 1 equivalente) y la mezcla se agitó a 0°C. Después de 2 horas, la mezcla se calentó a 25°C y se agitó durante 20 horas. La mezcla de reacción se diluyó con 150 ml de acetato de etilo y se lavó con 50 ml de H₂O. La capa acuosa se extrajo con 35 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El material bruto se cromatógrafió usando gel de sílice eluido con acetato de etilo al 50% en hexanos dando 913 mg (91%) de 21-azido-epotilona B, en forma de un aceite incoloro, transparente. EM (IEN⁺): 549,3 (M+H)⁺; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃); δ = 6,59 (s a, 17-H), 7,04 (s, 19-H), 4,63 (s, 21-H₂); EMAR (DCI); C₂₇H₄₀N₄O₆S: [M⁺] calculado 549,2747, encontrado 549,2768.

Ejemplo 15 (Referencia)

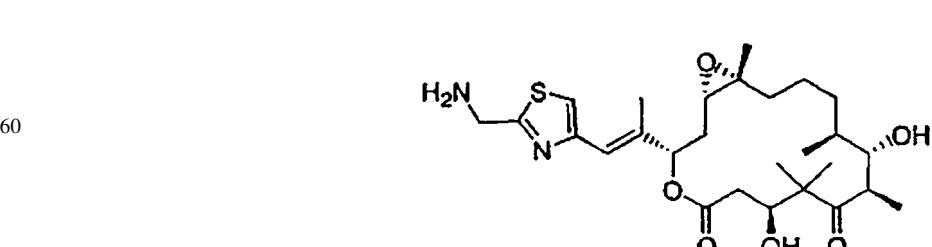
Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]-3-[2-[2-(Aminometil)-4-tiazolil]-1-metiletenil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4,17-dioxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona

40 Se suspendió catalizador de Lindlar, 18,0 mg, en 500 μl de etanol en una atmósfera de H₂ y se saturó. Después, se añadieron 15,9 mg (29,0 μmol) de la 21-azido-epotilona B del Ejemplo 14 anterior, disueltos en una mezcla etanol-metanol. Después de agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se filtró a través de tierras diatomeas, y se lavó con acetato de etilo. El disolvente se retiró de la fase orgánica y se secó a alto vacío. La purificación del producto bruto se realizó por PSC (disolvente: CH₂Cl₂/metanol 90:10), tras lo cual se obtuvieron 12,3 mg (81%) de 21-amino-epotilona B y 1 mg (6%) de educto.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃); δ = 6,58 (s a, 17-H), 7,05 (s, 19-H), 4,15 (s, 21-H₂); EMAR (DCI); C₂₇H₄₂N₂O₆S: [M + H⁺] calculado 522,2764, encontrado 522,2772.

Ejemplo 16 (Referencia)

Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]-3-[2-[2-(Aminometil)-4-tiazolil]-1-metiletenil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4,17-dioxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona (procedimiento alternativo)



A una solución agitada de 21-azido-epotilona B (Ejemplo 14) (1,070 g, 1,950 mmol) en 30,0 ml de tetrahidrofuran en una atmósfera de argón se le añadieron 0,22 ml de trimetilfosfina (0,163 g, 2,145 mmol, 1,1 equivalentes).

ES 2 325 055 T3

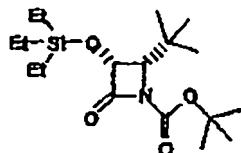
Después se añadió H₂O (5,5 ml), y la mezcla se dejó en agitación a 25°C. Después de 3 horas, la azida se consumió completamente y se añadieron 3 ml de NH₄OH acuoso al 28% para completar la conversión de fosforil imina a amina. Despues de agitar a 25°C durante 1 hora los disolventes se retiraron al vacío. El material bruto se cromatografió usando gel de sílice eluido con Et₃N al 1%, MeOH al 2,5% en CHCl₃ para producir 924 mg (91%) de 21-amino-epotilona B, en forma de un sólido blanco. EM (IEN⁺): 523,3 (M+H)⁺

5 Ejemplo 17 (Referencia)

Preparación de (\pm)-cis-4-terc-Butil-1-terc-butiloxicarbonil-3-trietilsiloxi-azetidin-2-ona

10

15



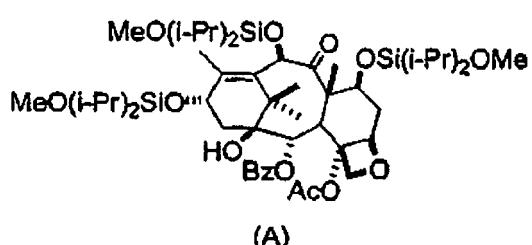
Se añadió trimetilacetaldehído (20,3 ml, 1,25 equiv.) a una suspensión agitada de p-anisidina (18,4 g, 0,150 mol) y Na₂SO₄ anhidro (150 g) en diclorometano anhidro (250 ml) a temperatura ambiente. Despues de 2 h, esto se filtró y el sólido se lavó con diclorometano anhidro adicional. El disolvente se retiró del filtrado y el residuo cristalino se disolvió en diclorometano anhidro (750 ml) y se puso en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió trietilamina (48,0 ml, 2,3 equiv.) y la reacción se enfrió a -78°C. Se añadió cloruro de bencilioacetilo (27,2 ml, 1,15 equiv.) gota a gota y después la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Despues de 24 h, esto se lavó con HCl 0,5 M (dos veces), solución acuosa sat. de NaHCO₃, salmuera y se secó (Na₂SO₄). El disolvente se retiró y el residuo se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (elución en gradiente con diclorometano al 20% en hexano que contenía del 0 al 20% de EtOAc) dando (\pm)-cis-4-terc-butil-3-bencilioxi-1-p-metoxibencil-azetidinona en forma de un sólido cristalino (46,9 g, 92%): ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,09 (s, 9 H), 3,81 (s, 3 H), 4,15 (d, 1 H, J = 5,5 Hz), 4,77 (d, 1 H, J = 11,9 Hz), 4,81 (d, 1 H, J = 5,5 Hz), 5,03 (d, 1 H, J = 11,9 Hz), 6,87-7,43 (m, 9 Hz); EMBR (IEN) 340 ([M+H]⁺). Una solución de nitrato célico de amonio (60,4 g, 3,6 equiv.) en 900 ml de agua se añadió a una solución bien agitada de la azetidinona (10,38 g, 30,6 mmol) en acetonitrilo (600 ml) en un baño de hielo durante 1 h. La reacción se extrajo entonces con EtOAc (dos veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa sat. de NaHCO₃ (dos veces), solución acuosa de NaHSO₃ al 20%, solución acuosa sat. de NaHCO₃ y salmuera. Despues de secarlos (Na₂SO₄), los disolventes se retiraron y el residuo se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (elución en gradiente con porciones de hexano que contenían del 10 al 40% de EtOAc) dando 5,64 g de (\pm)-cis-3-bencilioxi-4-terc-butil-azetidin-2-ona ligeramente impura: ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,04 (s, 9 H), 3,51 (d, 1 H, J = 5,2 Hz), 4,71 (m, 2 H), 4,96 (d, 1 H, J = 11,9 Hz), 6,10 (s a, 1 H), 7,35 (m, 5 H). Una suspensión de este material (5,54 g, 23,8 mmol) y 2,5 g de Pd al 10% sobre carbón en EtOH anhidro (100 ml) se hidrogenó (0,23 MPa (34 psi) de H₂, en un aparato Parr) durante 23 h. Se añadieron 2 g más del catalizador de Pd y la hidrogenación se continuó durante 17 h más a 0,34 MPa (50 psi) H₂. El catalizador se retiró por filtración y el disolvente se retiró del filtrado dando (\pm)-cis-3-hidroxio-4-(terc-butil)-azetidin-2-ona bruta: ¹H RMN (CDCl₃ + 1 gota de D₂O) δ 1,05 (s, 9 H), 3,48 (d, 1 H, J = 5,0 Hz), 4,98 (d, 1 H, J = 5,0 Hz). Este material se disolvió en N,N-dimetilformamida seca (40 ml) y se añadieron imidazol (3,24 g, 2 equiv.) y cloruro de trietilsililo (4,0 ml, 1 equiv.). Despues de 10 min, la reacción se repartió entre agua y una mezcla de EtOAc y hexano (1:1). La fase orgánica se lavó con agua (dos veces), salmuera y después se secó (Na₂SO₄). Los disolventes se retiraron y el residuo se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (elución en gradiente con EtOAc del 20 al 25% en hexano) dando (\pm)-cis-4-terc-butil-3-trietilsiloxi-azetidin-2-ona (3,86 g): ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,70 (m, 6 H), 0,98 (m, 18 H), 3,39 (d, 1 H, J = 5,0 Hz), 4,88 (dd, 1 H, J = 2,1, 5,0 Hz), 6,08 (s a, 1 H). Una solución de esta azetidinona (2,04 g, 7,92 mmol), diisopropiletil amina (1,66 ml, 1,2 equiv.), dicarbonato de di-terc-butilo (1,90 g, 1,1 equiv.) y p-dimetilaminopiridina (194 mg, 0,2 equiv.) en diclorometano seco (24 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con salmuera y se secó (Na₂SO₄). La retirada del disolvente seguido de cromatografía en columna sobre gel de sílice (elución en gradiente con EtOAc del 0 al 20% en hexano) dio 2,71 g (96%) del compuesto del título en forma de un aceite: ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,70 (m, 6 H), 1,00 (m, 9 H), 1,09 (s, 9 H), 1,53 (s, 9 H), 3,90 (d, 1 H, J = 6,5 Hz), 4,93 (d, 1 H, J = 6,5 Hz).

55 Ejemplo 18 (Referencia)

Preparación del derivado de bacatina A

60

65



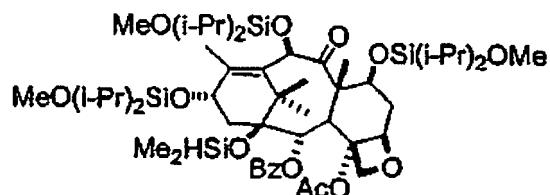
ES 2 325 055 T3

A una solución de 10-desacetilbacatina (47,4 g, 87 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (DMF) (500 ml) se le añadió imidazol (47 g, 691 mmol) a temperatura ambiente. La solución se agitó durante 10-15 min hasta que se observó una solución transparente. Se añadió diisopropildiclorosilano (58 ml, 322 mmol) gota a gota a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se añadió una cantidad adicional de 5 diisopropildiclorosilano (6 ml) a la solución y la mezcla de reacción se agitó durante 60 min. HPLC en este punto indicaba que se había completado la reacción. Se añadió metanol (36 ml) a la mezcla y la solución se agitó durante 60 min. La reacción se detuvo y se diluyó con una mezcla de terc-butil metil cetona (TBME) (500 ml) y agua (200 ml). Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (250 ml), se secó (sulfato sódico) y se evaporó dando 10 el derivado trisililado de bacatina A, (91 g, rendimiento >100%) en forma de un compuesto amorfo blanco que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

EMBR (IEN) M+ calculado para $C_{50}H_{84}O_{13}Si_3$: 977. Encontrado 977.

Ejemplo 19 (Referencia)

15 *Preparación del derivado de bacatina B*

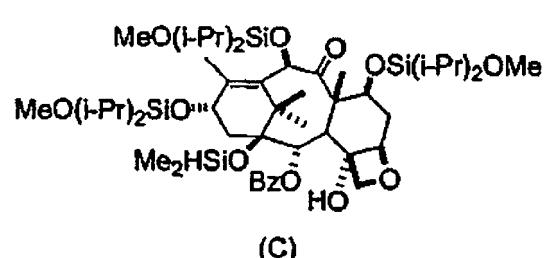


30 (B) A una solución del derivado de bacatina A (90 g, 92 mmol) en DMF (500 ml) se le añadió imidazol (22 g, 320 mmol) a 0°C. Se añade dimetilclorosilano (35 ml, 320 mmol) gota a gota a 0°C. La precipitación del compuesto se observó en este punto. La mezcla de reacción (suspensión) se agitó durante 0,5 h a 0°C. El sólido se filtró y se lavó con DMF fría (3 X 150 ml). Después se secar al aire, el sólido se redisolvió en TBME (700 ml) y la solución se lavó con agua (3 X 200 ml), salmuera (250 ml) y se secó (sulfato sódico). La solución se filtró a través de un lecho corto de sílice. La retirada del disolvente al vacío dio B con un rendimiento del 77% (70 g).

35 EMBR (IEN) M+ calculado para $C_{50}H_{90}O_{13}Si_4$: 1035. Encontrado 1035.

Ejemplo 20 (Referencia)

40 *Preparación del derivado de bacatina C*



55 A una solución agitada de B (66,3 g, 64 mmol) en tolueno (680 ml) a -34°C se le añadió Red-Al® (50 ml, 160 mmol, solución al 65% en peso de hidruro sódico de bis(2-metoxietoxi)aluminio en tolueno) gota a gota durante un periodo de 10 min. La mezcla de reacción se calentó a -25°C y se agitó durante 1,5 h. Se añadió metanol (62 ml) gota a gota a la mezcla de reacción manteniendo la temperatura interna entre -20 y -25°C. La solución se diluyó con TBME (500 ml) seguido de la adición de solución 1 N de hidróxido sódico (60 ml) y salmuera (60 ml). La solución se agitó durante 30 min. Se añadieron tierras diatomeas (12 g) a la mezcla, se agitó durante 10 min, y se filtró a través de una capa de tierras diatomeas. Las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con agua, salmuera, y se secó (sulfato sódico). Después, la solución se pasó a través de un lecho corto de sílice antes de la retirada del disolvente. El compuesto se obtuvo con un rendimiento del 97% (62 g) en forma de un sólido blanco.

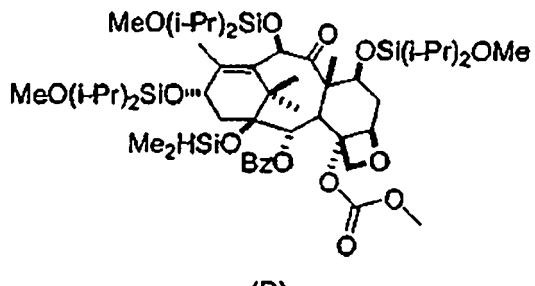
65 EMBR (IEN) M+ calculado para $C_{50}H_{88}O_{12}Si_4$: 993. Encontrado 993.

ES 2 325 055 T3

Ejemplo 21 (Referencia)

Preparación del derivado de bacatina D

5



10

15

En una atmósfera de argón atmósfera, a una solución del derivado de bacatina C (62 g, 62 mmol) en tetrahidrofurano anhídrico (THF) (600 ml) a -60°C se le añadió bis(trimetilsilil)amiduro de litio (125 ml, 125 mmol, solución 1 M en THF) gota a gota. La solución se agitó durante 15 min seguido de la adición de cloroformiato de metilo (9 ml, 116 mmol); la temperatura interna de la solución se mantuvo a -60°C. La reacción se calentó lentamente a 0°C y la mezcla se agitó durante 3 h. Después de completar la reacción, se añadió cloruro de amonio saturado (300 ml). La mezcla de reacción se extrajo con TBME (100 ml). La fase orgánica se lavó con cloruro de amonio saturado (200 ml), agua (200 ml), salmuera (200 ml), se secó (sulfato sódico), y se evaporó proporcionando D en forma de un aceite (67 g, >100%). El material bruto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

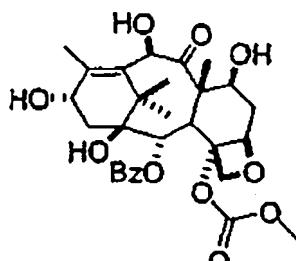
20

EMBR (IEN) M+ calculado para $C_{52}H_{90}O_{14}Si_4$: 1051. Encontrado 1051.

Ejemplo 22 (Referencia)

30 *Preparación del derivado de bacatina E*

35



40

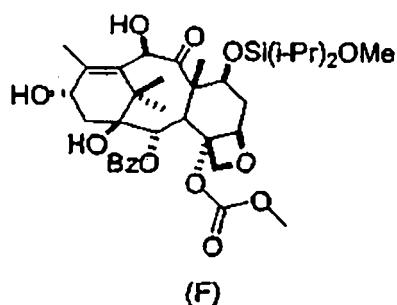
45

EMBR (IEN) M+ calculado para $C_{29}H_{36}O_{11}$: 560. Encontrado 560.

Ejemplo 23 (Referencia)

55 *Preparación del derivado de bacatina F*

60



65

ES 2 325 055 T3

A una solución agitada del derivado de bacatina E (32 g, 57 mmol) e imidazol (11,7 g, 172 mmol en DMF (220 ml)) a 65°C se le añadió diisopropildiclorosilano (26,8 ml) en atmósfera de argón. La temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a -60°C y la mezcla se agitó durante 2 h. Una vez completada la reacción (HPLC), se añadió una solución de imidazol en metanol (11,7 g imidazol disuelto en 35 ml de metanol) y la solución se agitó a 0°C durante 5 30 min. La mezcla se extrajo con TBME (500 ml). La fase orgánica se lavó con agua (4 x 150 ml), se secó (sulfato sódico), y se evaporó dando F bruto (45 g). El material bruto se disolvió adicionalmente en acetonitrilo (150 ml) y la solución se lavó con hexanos (3 X 100 ml). La retirada del acetonitrilo dio F puro en forma de un sólido blanco (34 g, rendimiento del 84%).

10 EMBR (IEN) M+ calculado para C₃₆H₅₂O₁₂Si: 704. Encontrado 704.

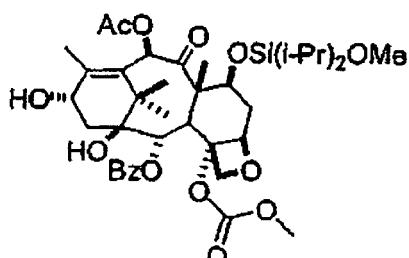
Ejemplo 24 (Referencia)

Preparación de 4-desacetil-7-[bis(isopropil(metoxi)siloxi)-4-metoxicarbonil]bacatina

15

20

25



A una solución del derivado de bacatina F (33,2 g, 47 mmol) en DMF (200 ml) se le añadió bis(trimetilsilil)amiduro de litio (61,2 ml, 61,2 mmol, solución 1 M en THF) gota a gota a -43°C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 min seguido de la adición de anhídrido acético (5,8 ml, 63 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. a -40°C. Se añadió ácido acético (3,6 ml) y el baño de refrigeración se retiró. La mezcla de reacción se extrajo con TBME (300 ml). La fase orgánica se separó y se lavó con agua (3 x 150 ml), salmuera (150 ml), se secó (sulfato sódico), y se evaporó dando el producto bruto. La purificación de este compuesto se consiguió por cristalización en una mezcla de THF:heptano (1:6). La introducción de 40 g proporcionó 21 g del producto del título cristalizado (rendimiento del 60%).

35

EMBR (IEN) M+ calculado para C₃₈H₅₄O₁₃Si: 746. Encontrado 746.

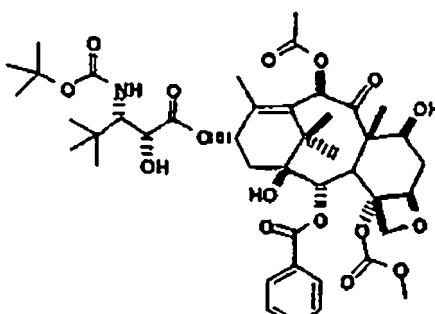
Ejemplo 25 (Referencia)

40 Preparación de 3'-terc-Butil-3'-N-terc-butiloxycarbonil-4-desacetil-3'-defenil-3'-N-debenzoil-4-O-metoxi-carbonil-paclitaxel

45

50

55



Una solución de (\pm)-cis-4-terc-butil-1-(terc-butiloxycarbonil)-3-trietilsiloxi-azetidin-2-ona (2,71 g, 5 equiv.) y 4-desacetil-7-[bis(isopropil(metoxi)siloxi)-4-metoxicarbonil]bacatina (1,13 g, 1,52 mmol) en THF seco (100 ml) en una atmósfera de N₂ se enfrió a -50°C y se añadió una solución de bis(trimetilsilil)amiduro de litio (1,97 ml, 1,3 equiv, 1,0 M en THF). Después de 5 min esto se transfirió a un baño que se mantuvo a de -35 a -30°C durante 20 h y después a -25°C durante 24 h. La reacción se interrumpió después con solución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con una mezcla de EtOAc y hexano (1:1). Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera y se secaron (Na₂SO₄). Los disolventes se retiraron y el residuo se cromatógrafió (cromatografía radial sobre una placa de gel de sílice de 6 mm; elución en gradiente con EtOAc del 5 al 20% en hexano) dando 1,55 g de 3'-terc-butil-3-N-terc-butiloxycarbonil-7-[bis(isopropil(metoxi)siloxi)-4-desacetil-3'-defenil-3'-N-debenzoil-4-O-metoxicarbonil-2'-trietilsiloxi paclitaxel en forma de una mezcla de 2',3'-diastereómeros. Esta mezcla se disolvió en THF seco (60 ml) y se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (0,92 ml 4 equiv.). Después de 22 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se neutralizó con solución ac. saturada de NaHCO₃ y después se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera,

ES 2 325 055 T3

se secaron (Na_2SO_4) y los disolventes se retiraron. El residuo se cromatógrafió (cromatografía radial; placa de gel de sílice de 2 mm; gradiente de elución de EtOAc del 10 al 50% en hexano) dando (en orden de elución): 210 mg (18%) de 2'S,3'R-3'-terc-butil-3-'N-terc-butiloxicarbonil-4-desacetil-3'-defenil-3'-N-debenzoil-4-O-metoxicarbonil-paclitaxel { ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,04 (s, 9 H), 1,13 (s, 3 H), 1,20 (s, 3 H), 1,37 (s, 9 H), 1,65 (s, 1 H), 1,66 (s, 3 H),

5 1,84-1,93 (m, 2 H), 2,17 (s, 3 H), 2,25 (s, 3 H), 2,55 (m, 3 H), 3,00 (d, 1 H, $J = 6,5$ Hz), 3,74 (d, 1 H, $J = 10,8$ Hz),
3,79 (d, 1 H, $J = 6,9$ Hz), 3,92 (s, 3 H), 4,16 (d, 1 H, $J = 8,5$ Hz), 4,33 (d, 1 H, $J = 8,5$ Hz), 4,42 (m, 1 H), 4,54 (d, 1 H,
 $J = 6,5$ Hz), 4,87 (d, 1 H, $J = 10,6$ Hz), 5,01 (d, 1 H, $J = 7,7$ Hz), 5,68 (d, 1 H, $J = 7,0$ Hz), 5,76 (m, 1 H), 6,32 (s, 1 H),
7,44-8,05 (m, 5 H); EMBR (IEN) 846 $\{[(\text{M}+\text{H})^+]\}$ y 668 mg (56%) del compuesto del título { ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,07
10 (s, 9 H), 1,14 (s, 3 H), 1,24 (s, 3 H), 1,33 (s, 9 H), 1,66 (s, 4 H), 2,23 (s, 3 H), 2,38-2,59 (m, 4 H), 3,11 (d, 1 H, $J = 5,8$
Hz), 3,77 (d, 1 H, $J = 11,1$ Hz), 3,82 (d, 1 H, $J = 7,0$ Hz), 3,96 (s, 3 H), 4,20 (d, 1 H, $J = 8,6$ Hz), 4,33 (d, 1 H, $J = 8,6$
Hz), 4,39 (m, 1 H), 4,53 (d, 1 H, $J = 5,4$ Hz) 4,88 (d, 1 H, $J = 10,6$ Hz), 4,98 (d, 1 H, $J = 7,9$ Hz), 5,69 (d, 1 H, $J = 7,1$
Hz), 6,03 (m, 1 H), 6,28 (s, 1 H), 7,40-8,11 (m, 5 H);

EMBR (IEN) 846 $\{[(\text{M}+\text{H})^+]\}$.

15

La presente invención no se limita a las realizaciones descritas específicamente anteriormente, sino que es susceptible a variación y modificación sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento sinérgico del cáncer en una especie de mamífero de (1) al menos un agente seleccionado entre el grupo constituido por paclitaxel.

[1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona,

CPT-11, gemitabina,

4-(3-bromofenilamino)-6,7-bis(metoxi)quinazolina, gefitinib, trastuzumab, tamoxifeno, bicalutamida, y

N-[5-[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidina-carboxamida; y (2)

(R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepin-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en el que el agente (1) se administra simultáneamente con, o antes de, el compuesto (2).

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (2) se selecciona entre el grupo constituido por la sal clorhidrato, la sal ácido metanosulfónico y la sal ácido trifluoroacético.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que agente (1) se administra antes del compuesto (2).

4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la especie de mamífero es un ser humano.

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el tratamiento sinérgico de tumores sólidos cancerosos.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el cáncer es un cáncer de próstata, de mama, un cáncer pulmonar macrocítico, un cáncer de vejiga metastásico, un cáncer colorectal, o un cáncer pancreático.

7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el agente (1) es paclitaxel.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 en el que el paclitaxel se administra antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el paclitaxel se administra durante aproximadamente tres horas de infusión a aproximadamente 135 mg/m² seguido de una hora de infusión de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a aproximadamente 50 mg/m², administrándose tanto paclitaxel como (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a intervalos de aproximadamente tres semanas según se necesite.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el paclitaxel se administra durante aproximadamente una hora de infusión a aproximadamente 80 mg/m² seguido de aproximadamente una hora de infusión de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a aproximadamente 80 mg/m², administrándose tanto paclitaxel como (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a intervalos aproximadamente semanales según se necesite.

11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el agente (1) es [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1,0]heptadecano-5,9-diona.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabiciclo[4.1.0]heptadecano-5,9-diona se administra antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra CPT-11 antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ES 2 325 055 T3

14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra gemcitabina antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra 4-(3-bromofenilamino)-6,7-bis(metoxi)quinazolina antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra gefitinib antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra trastuzumab antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 18. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra tamoxifeno antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra bicalutamida antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 20. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que se administra N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidincarboxamida antes de la administración de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 21. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que se administran dos agentes citotóxicos, siendo dichos agentes paclitaxel, que se infunde durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 135 mg/m² seguido de aproximadamente una infusión de veinte minutos de carboplatino a una ABC igual a aproximadamente 6, administrándose paclitaxel y carboplatino a intervalos de aproximadamente tres semanas, comprendiendo adicionalmente una administración aproximadamente semanal de (R)-2,3,4,5-tetrahidro-1-(1H-imidazol-4-ilmetil)-3-(fenilmetil)-4-(2-tienilsulfonil)-1H-1,4-benzodiazepina-7-carbonitrilo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a aproximadamente 80 mg/m².

40

45

50

55

60

65

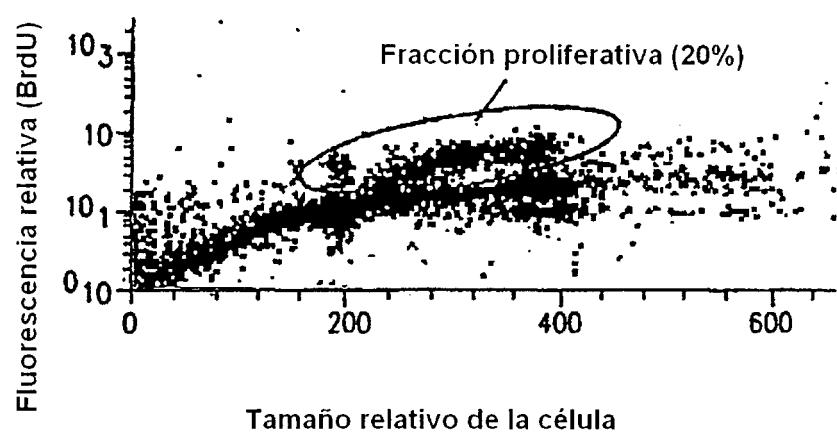


FIG. 1

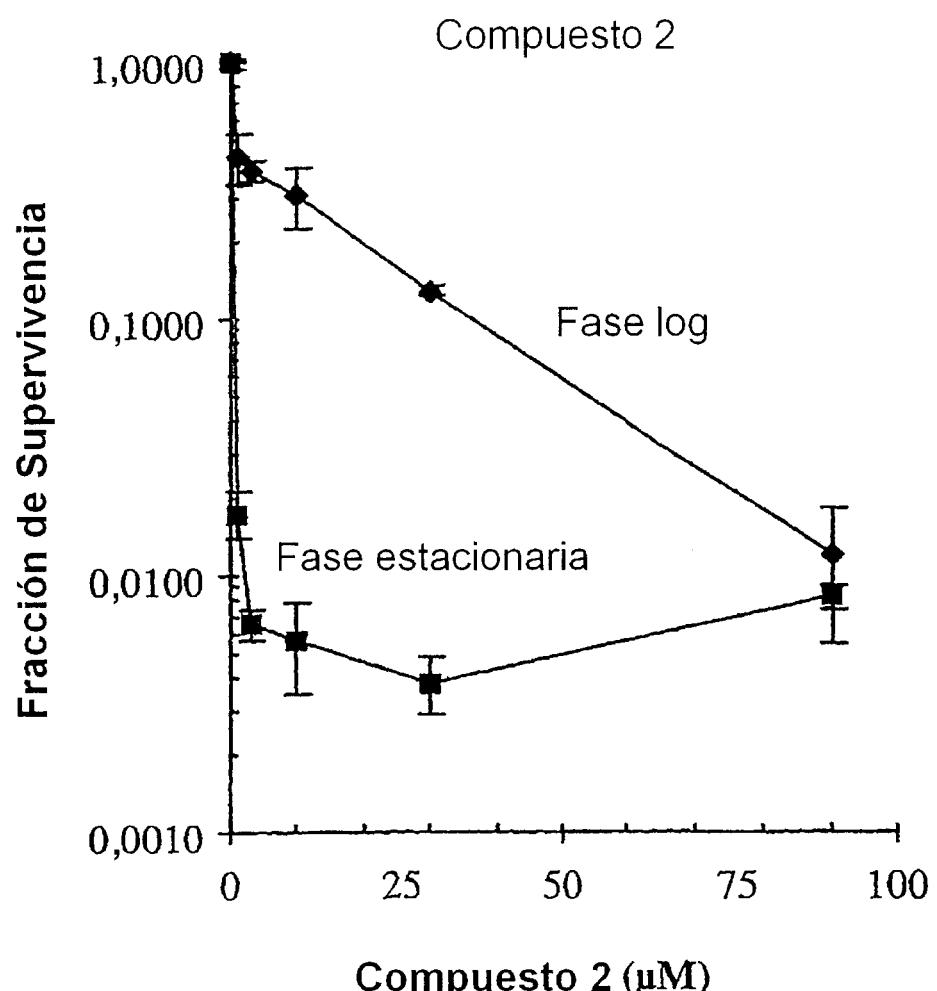


FIG. 2

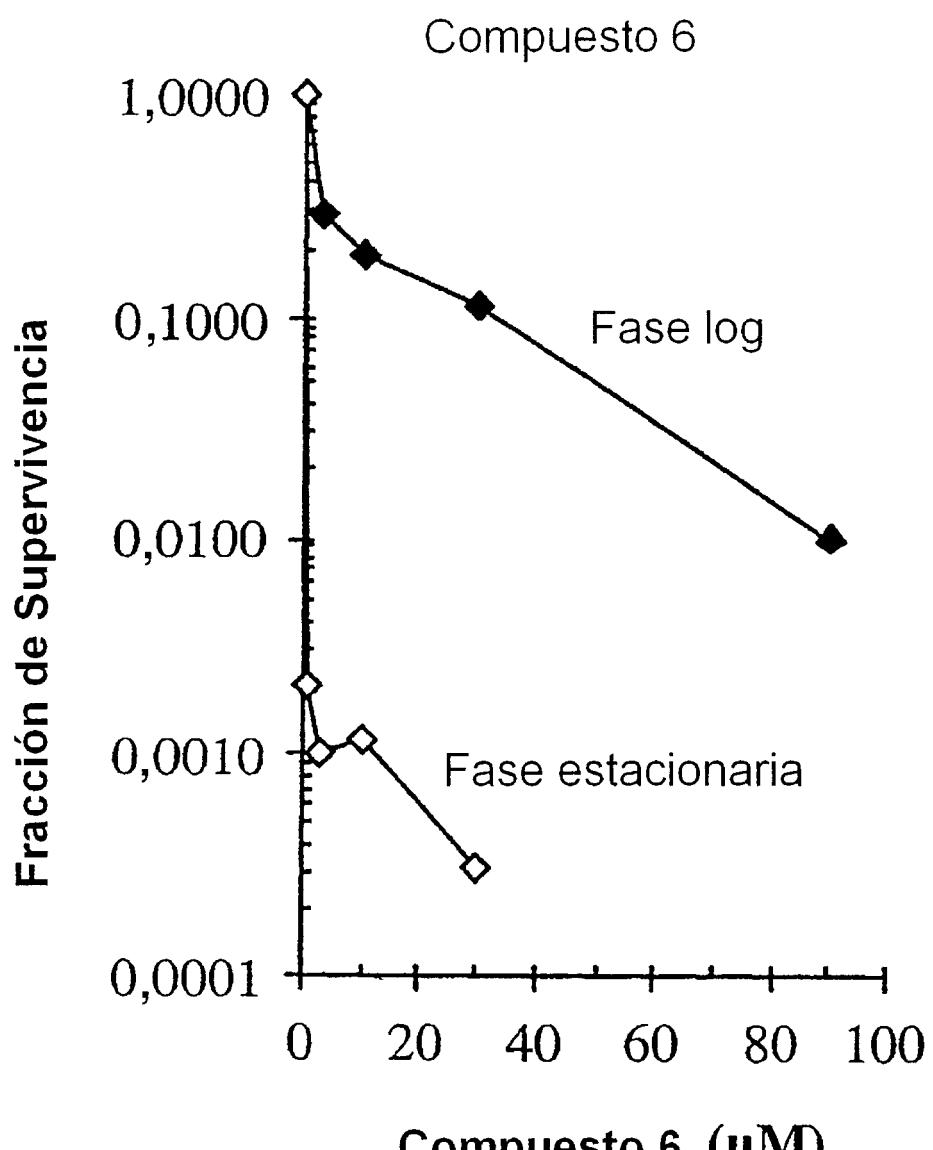
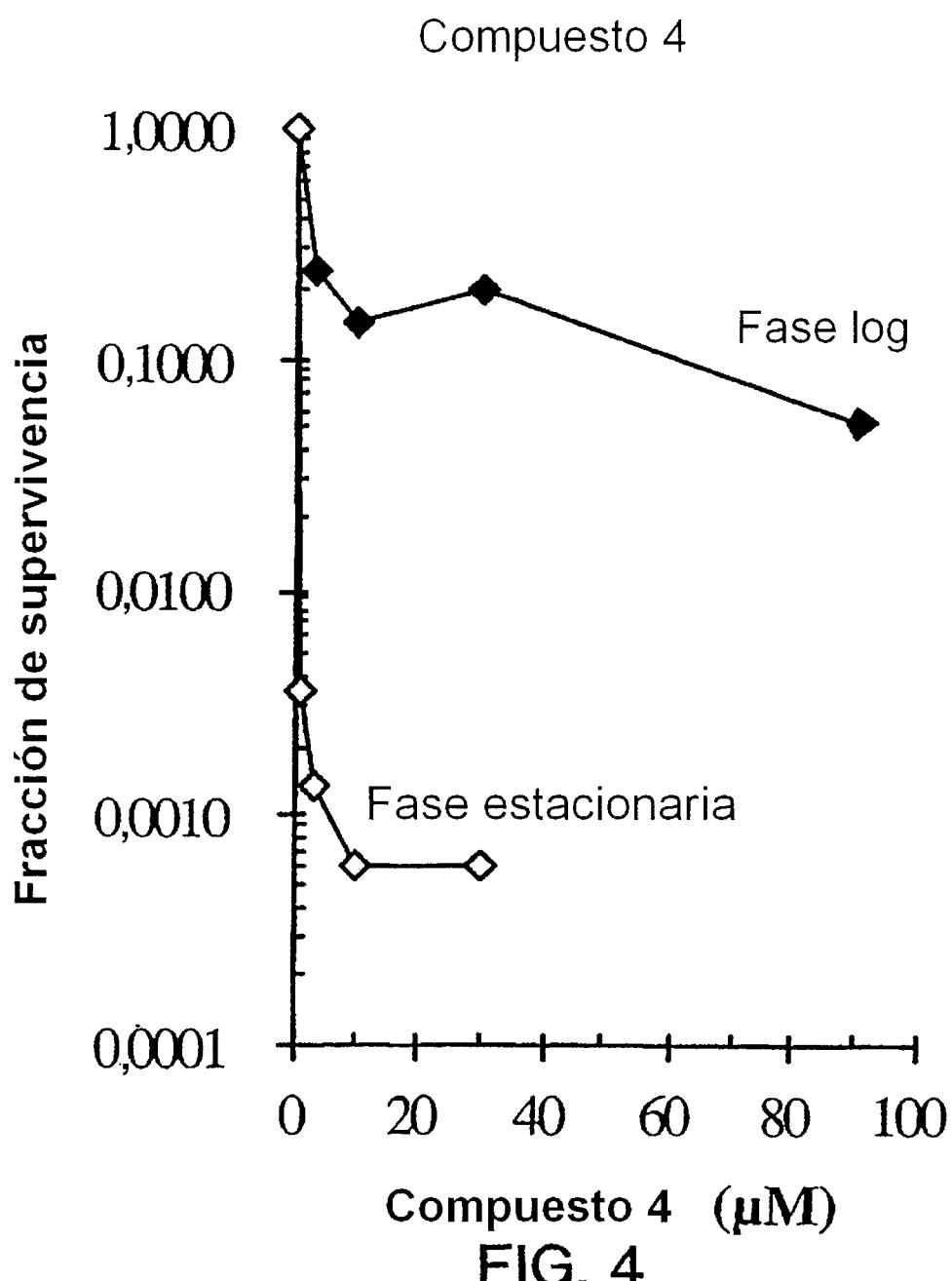
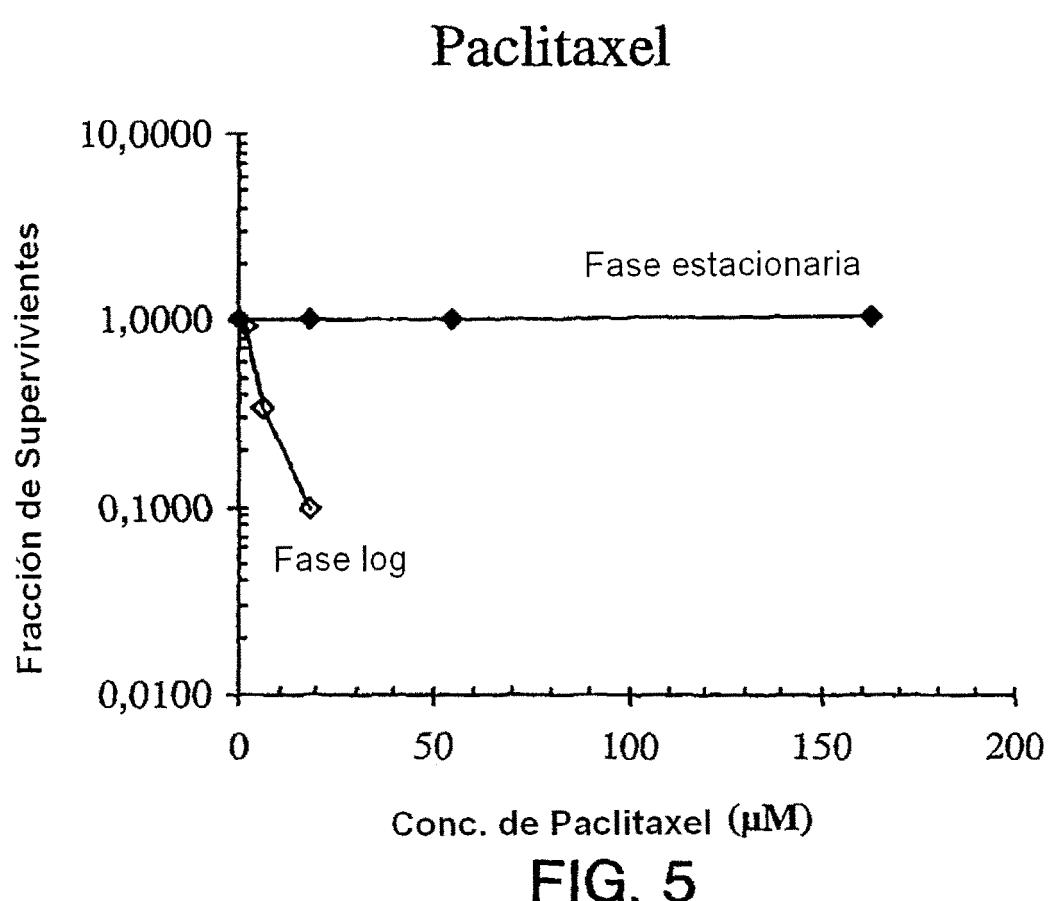
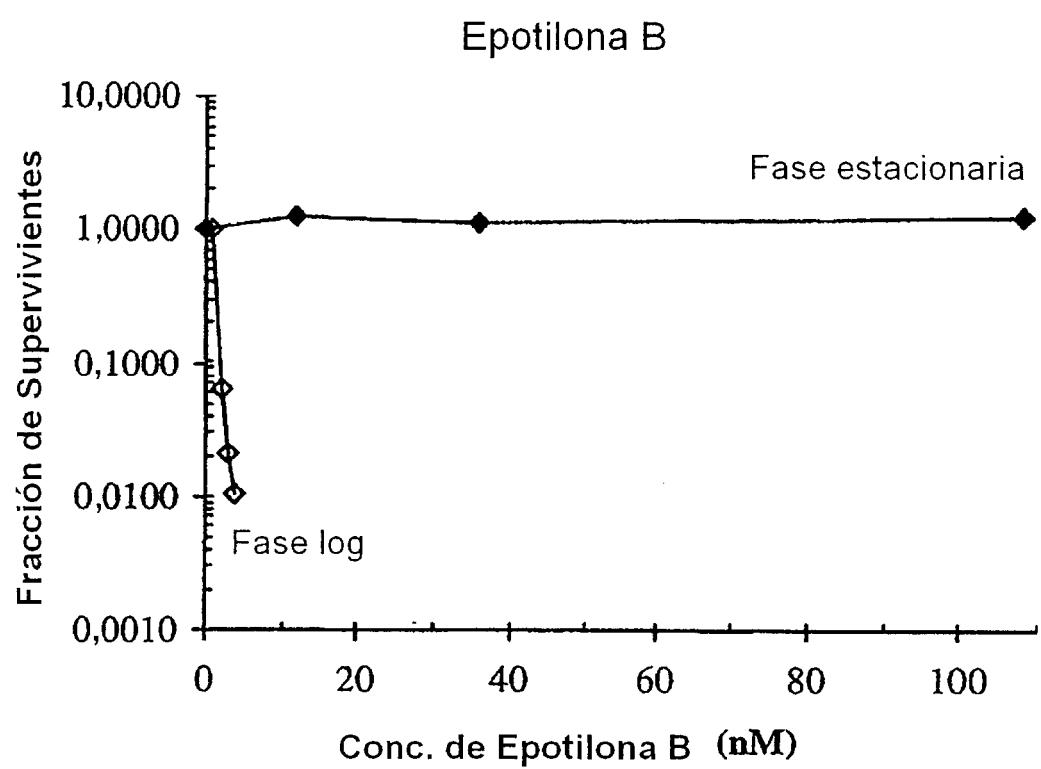


FIG. 3







Quimioterapia combinada con Paclitaxel + Compuesto 2

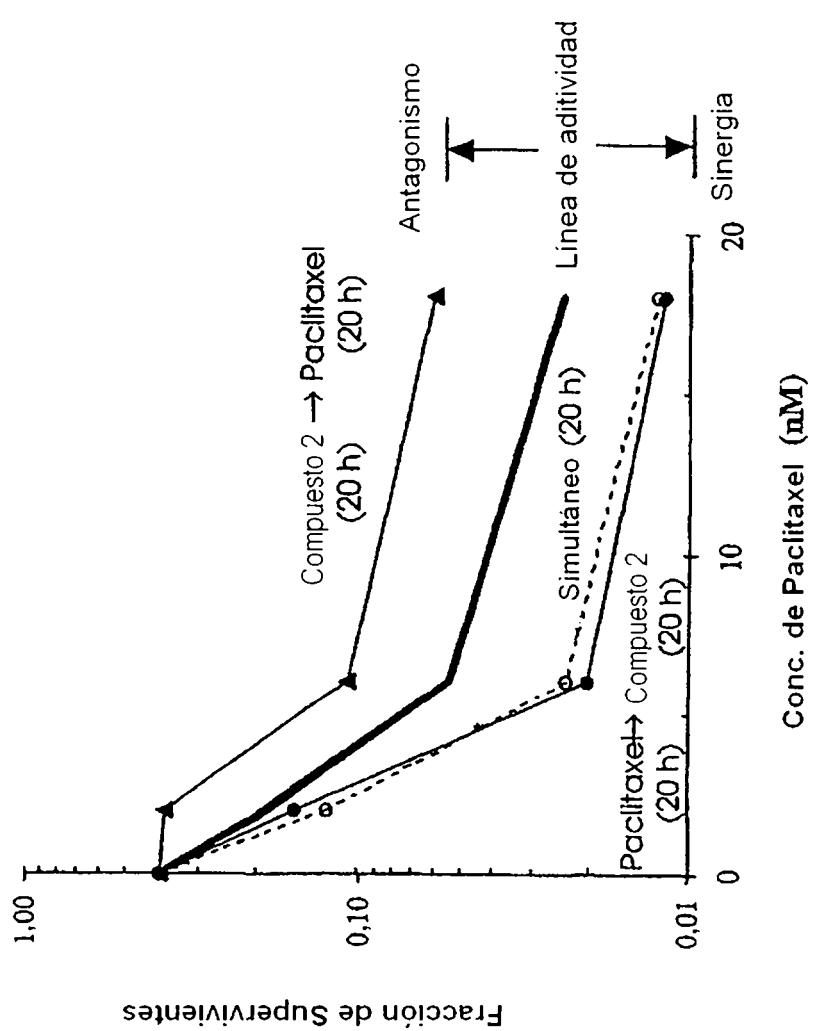


FIG. 7

Quimioterapia combinada con Compuesto 1 + Compuesto 2

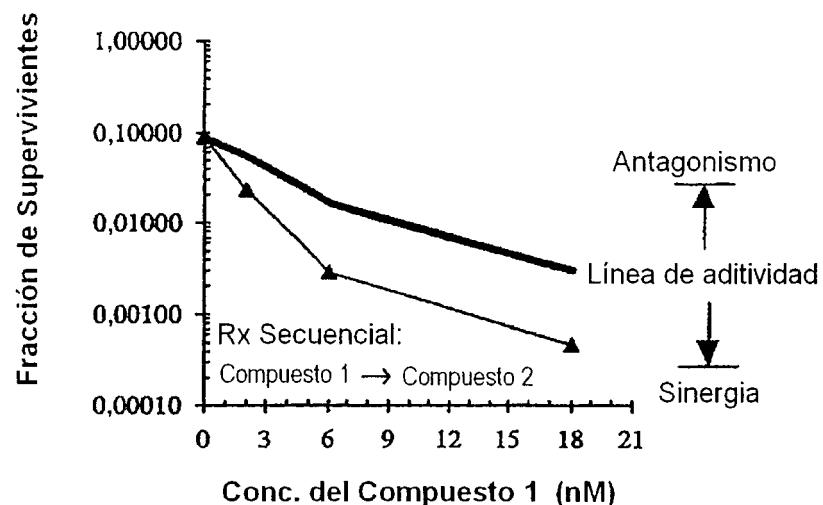


FIG. 8

Quimioterapia combinada con Compuesto 1 + Compuesto 2

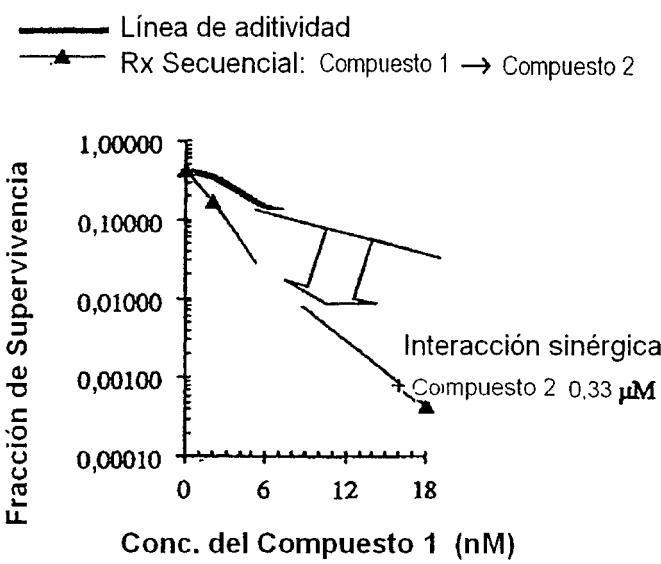


FIG. 9

ES 2 325 055 T3

Quimioterapia combinada con Compuesto 1 + Compuesto 2

— Línea de aditividad
▲ Rx Secuencial: Compuesto 1 → Compuesto 2

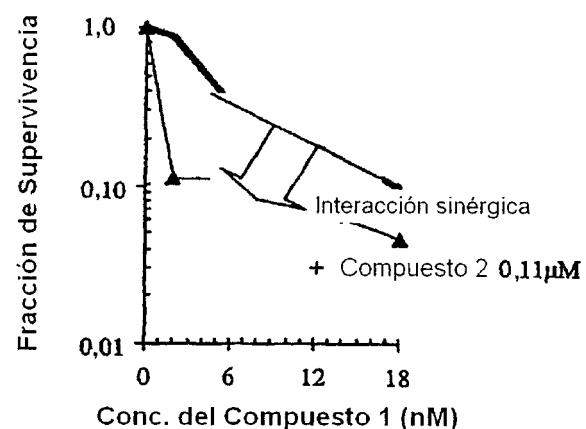


FIG. 10

Quimioterapia combinada con Paclitaxel + Compuesto 2

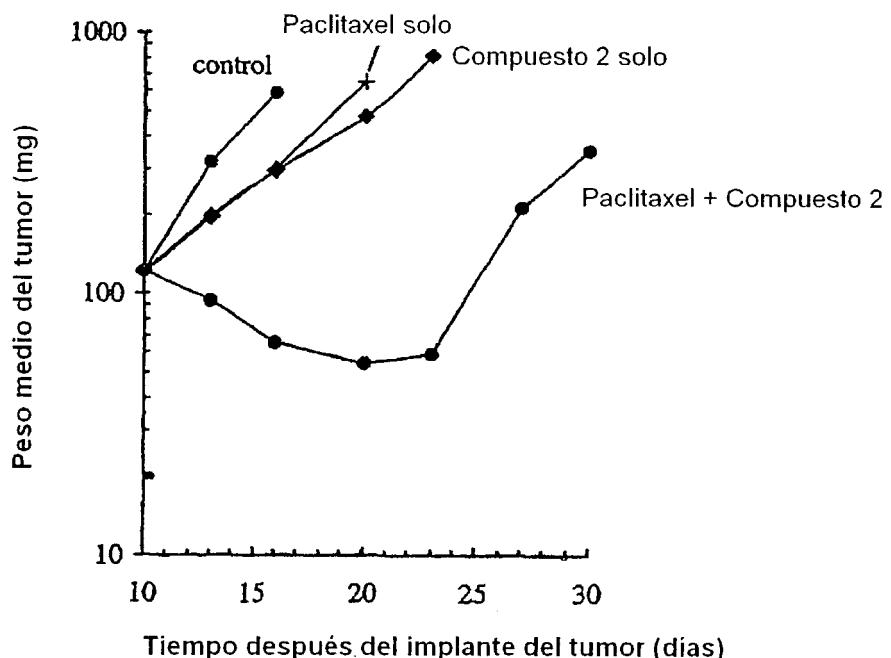


FIG. 11

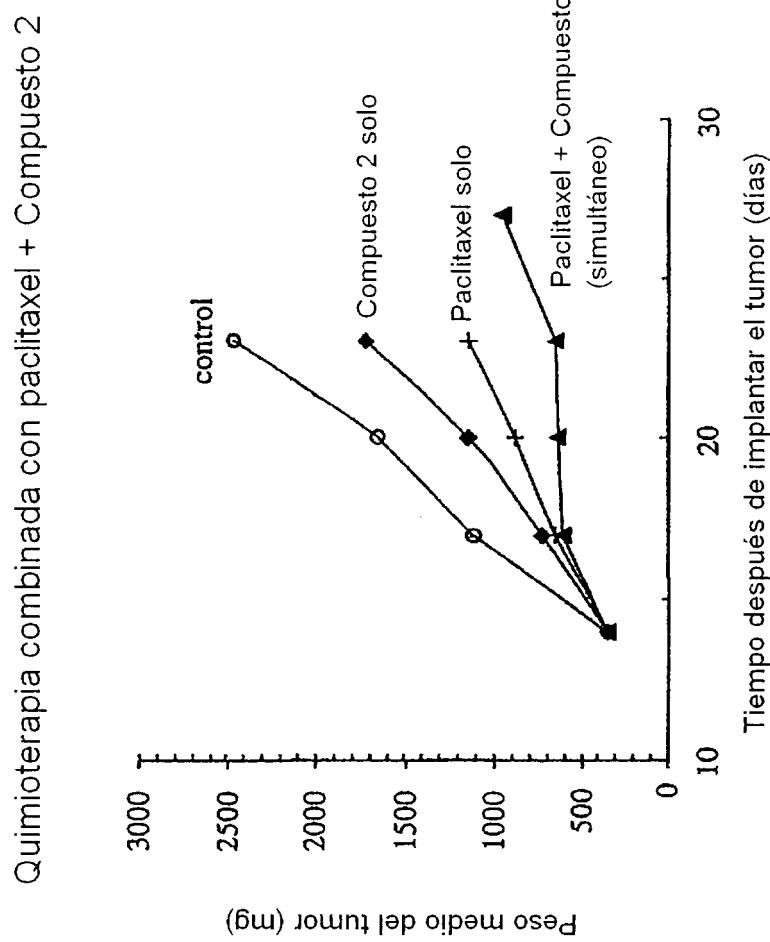


FIG. 12

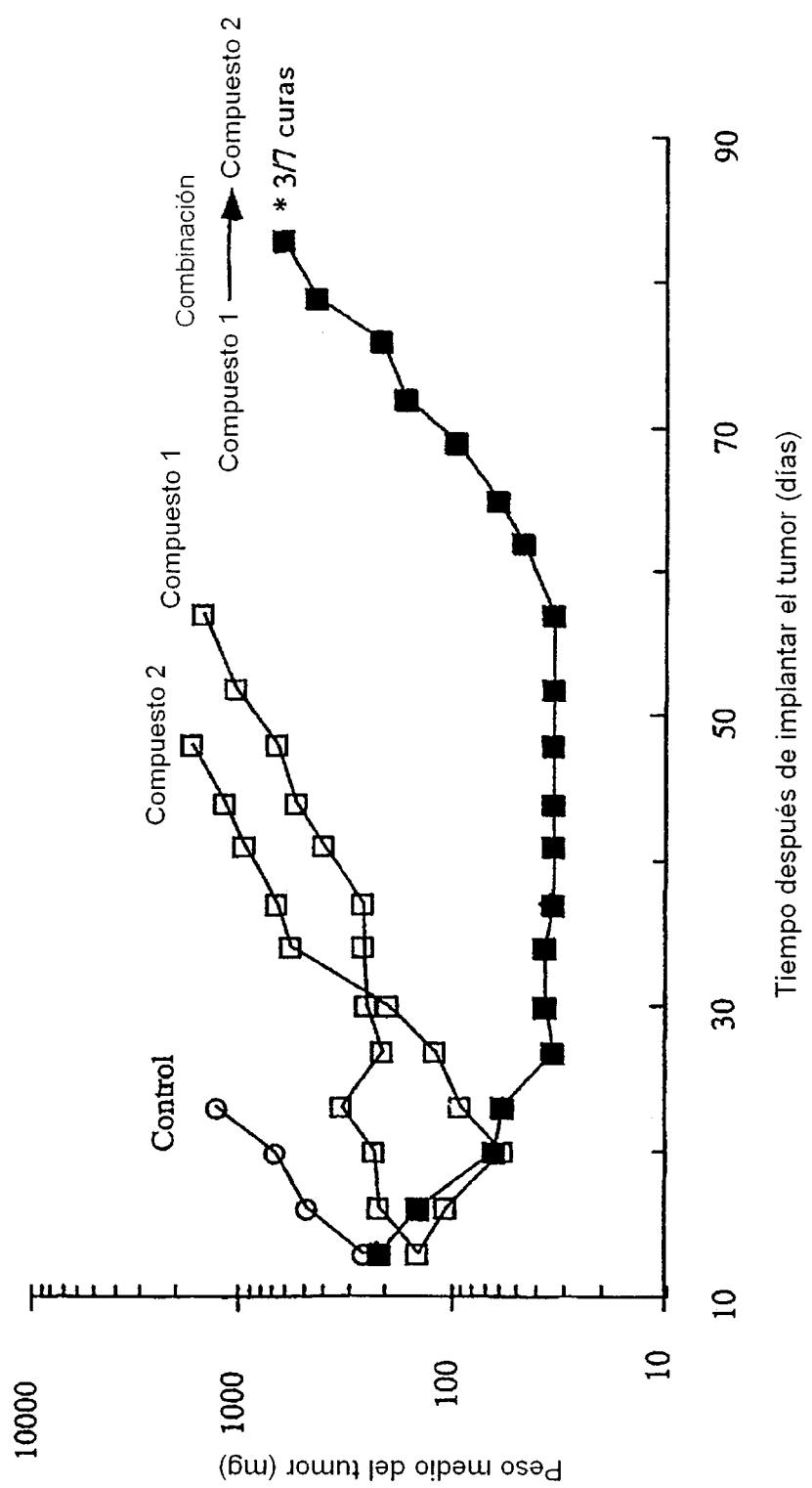


FIG. 13

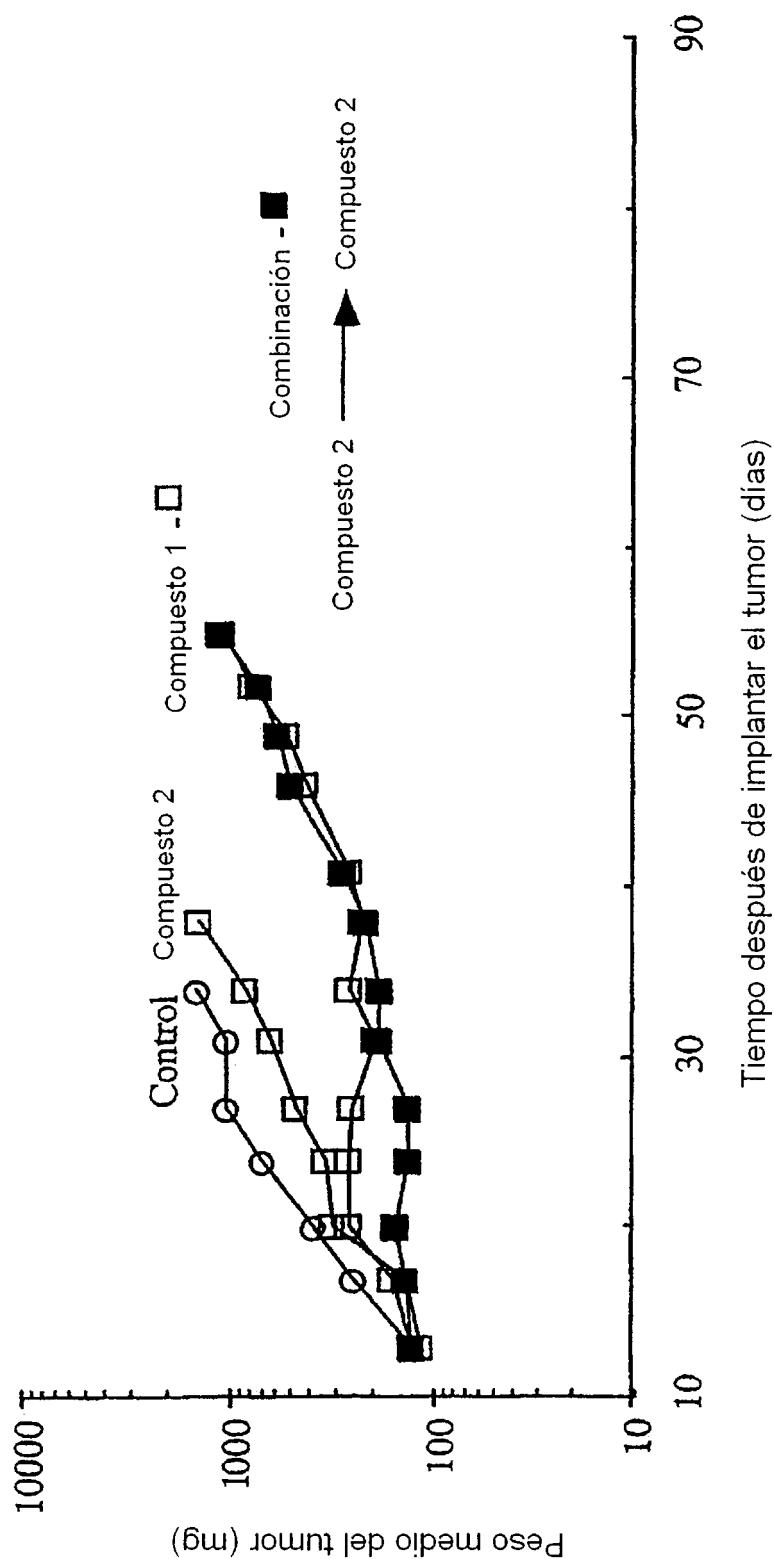
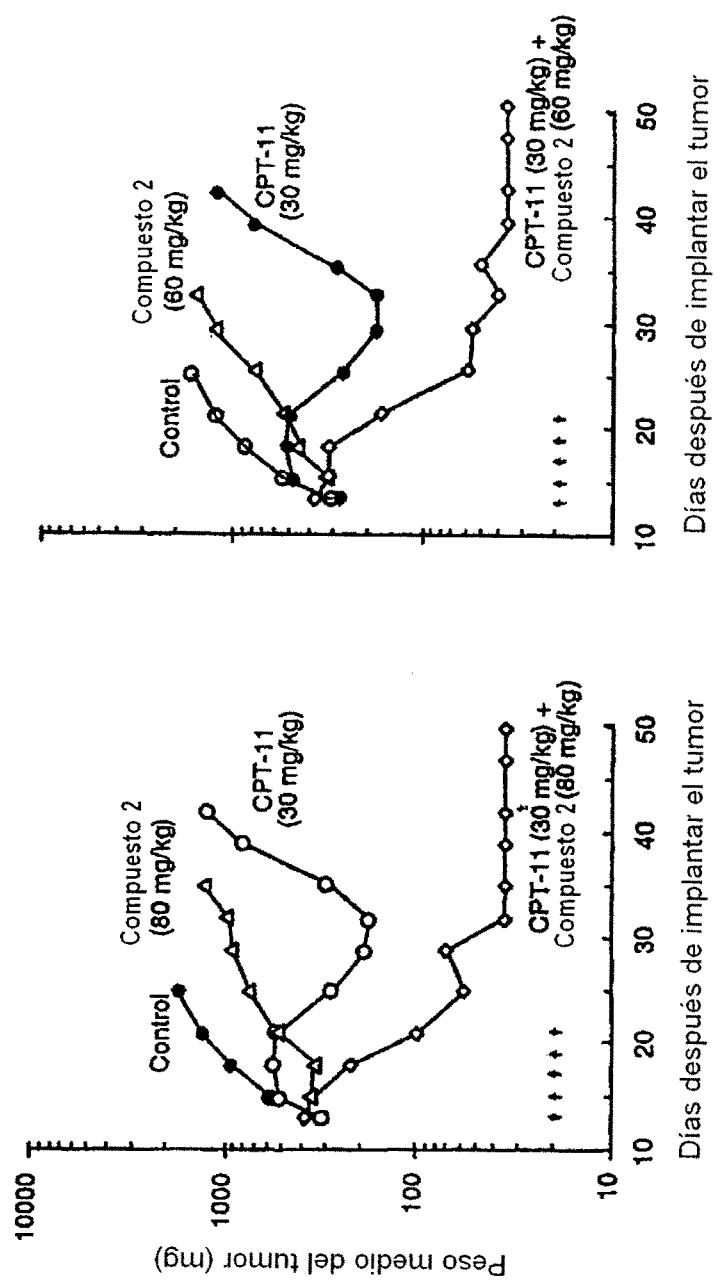


FIG. 14

**FIG. 15B**

ES 2 325 055 T3

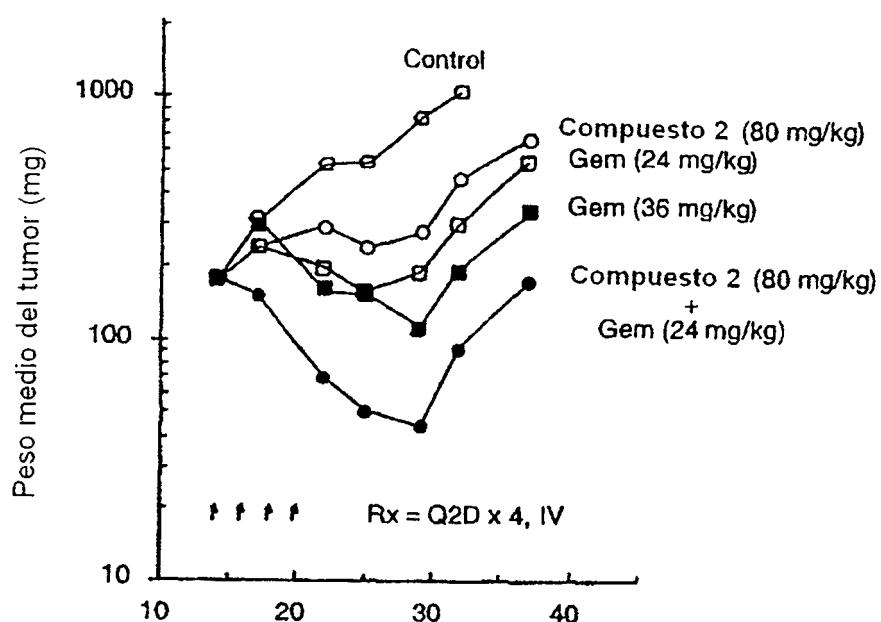


FIG. 16A

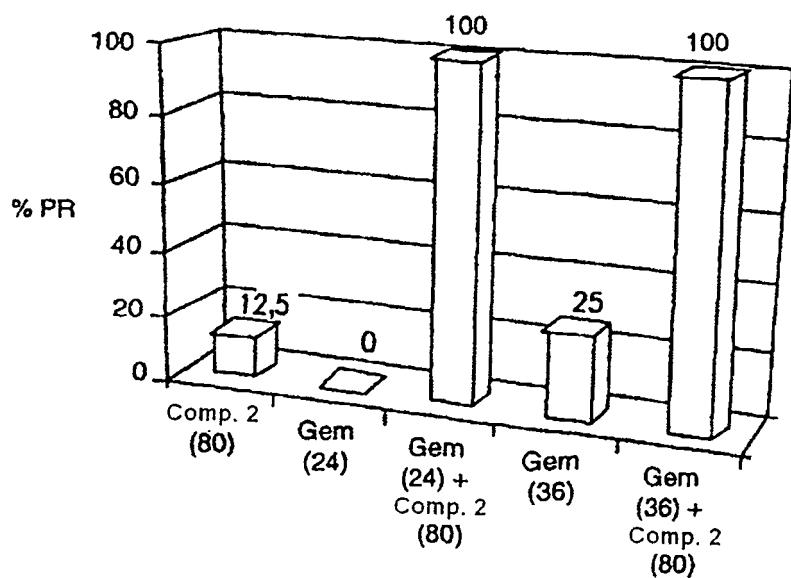


FIG. 16B

ES 2 325 055 T3

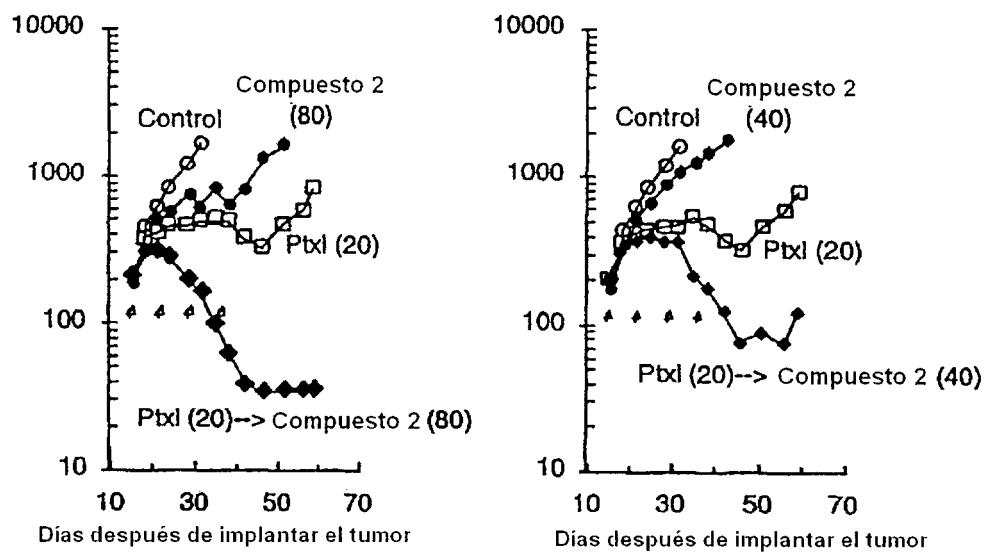


FIG. 17A

FIG. 17B

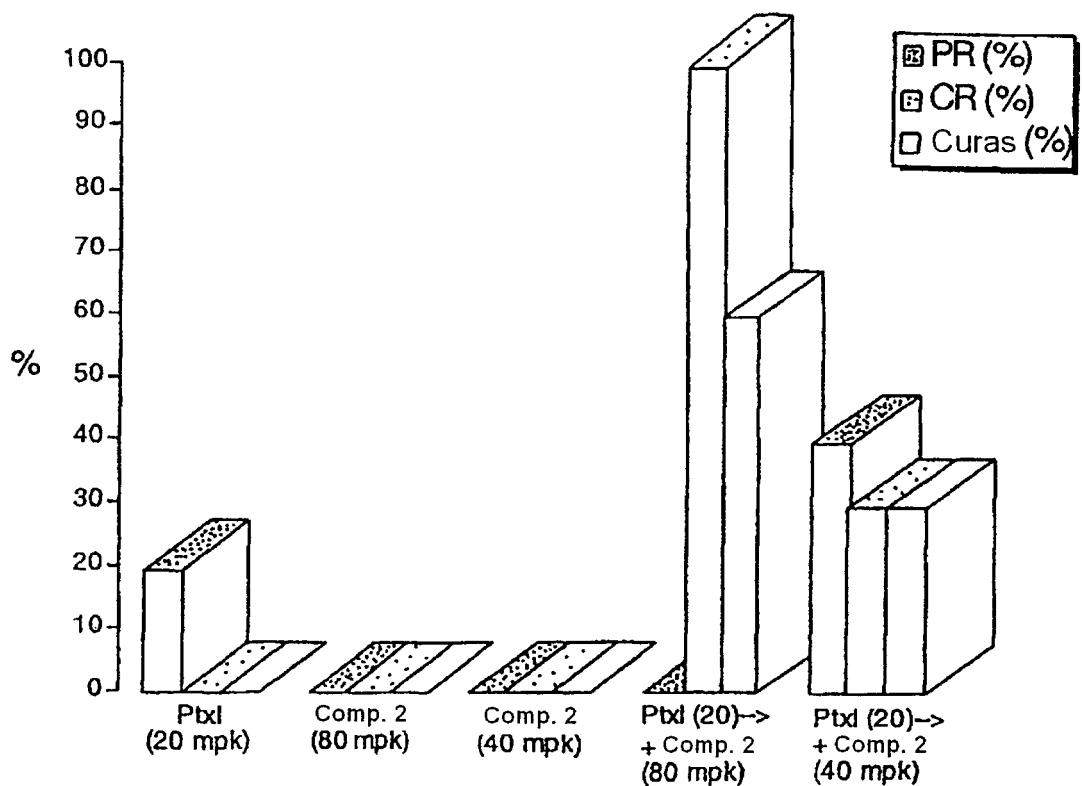


FIG. 17C

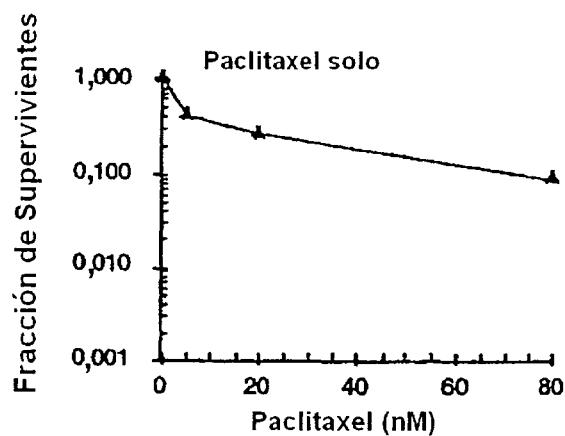


FIG. 18A

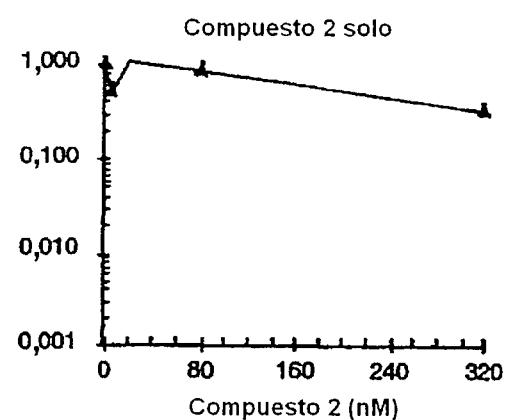


FIG. 18B

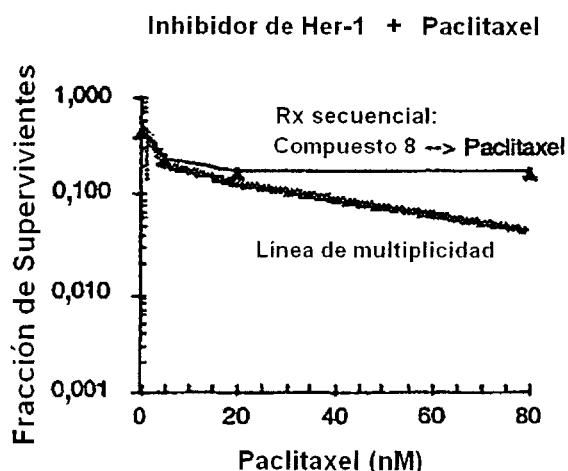


FIG. 18C

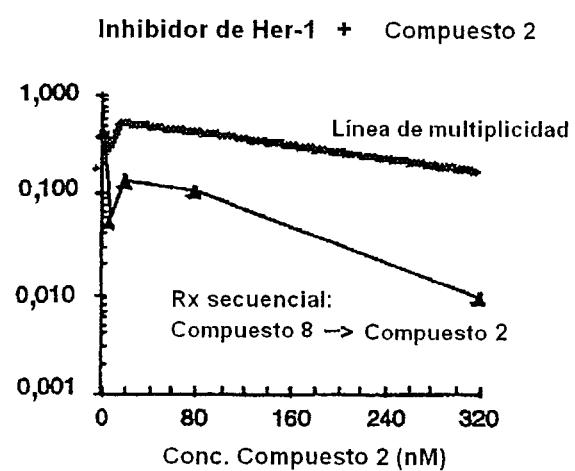
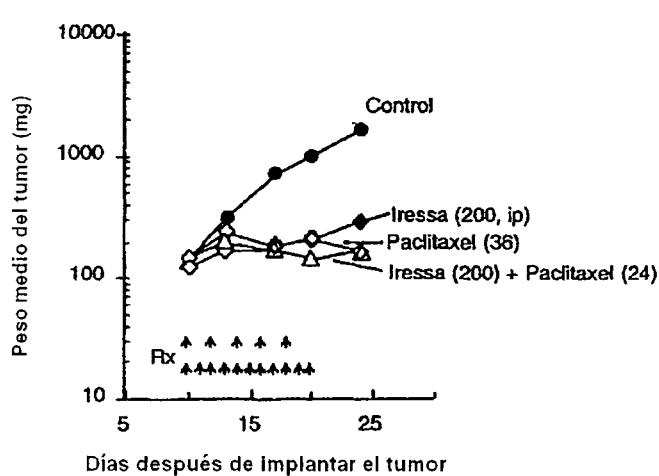
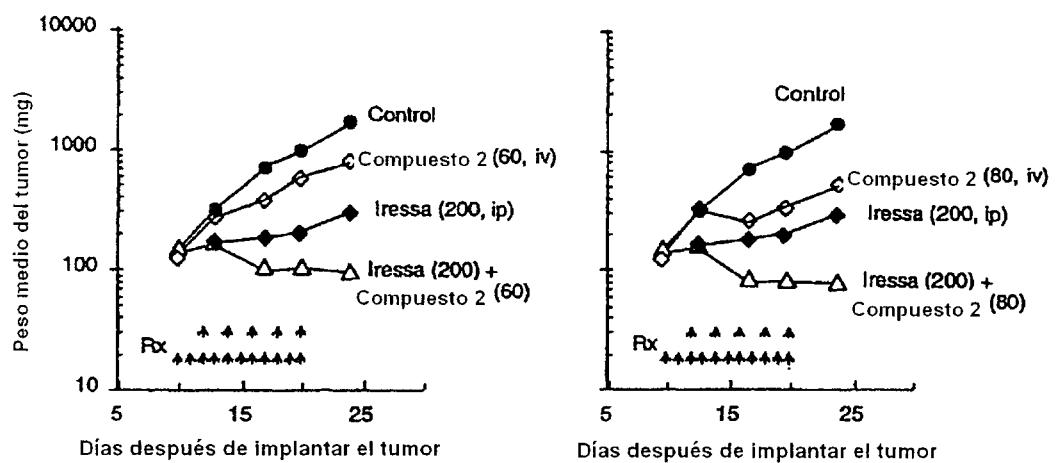


FIG. 18D

ES 2 325 055 T3



ES 2 325 055 T3

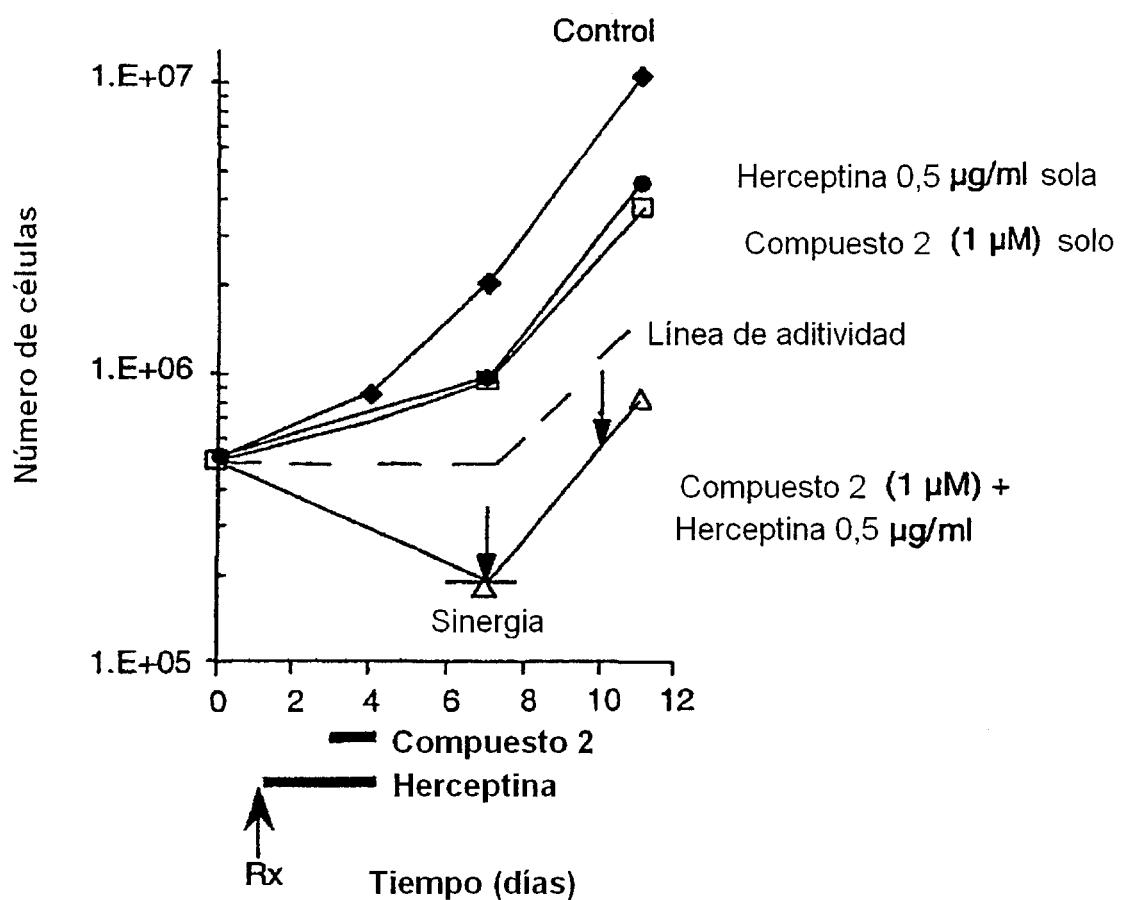


FIG. 19

ES 2 325 055 T3

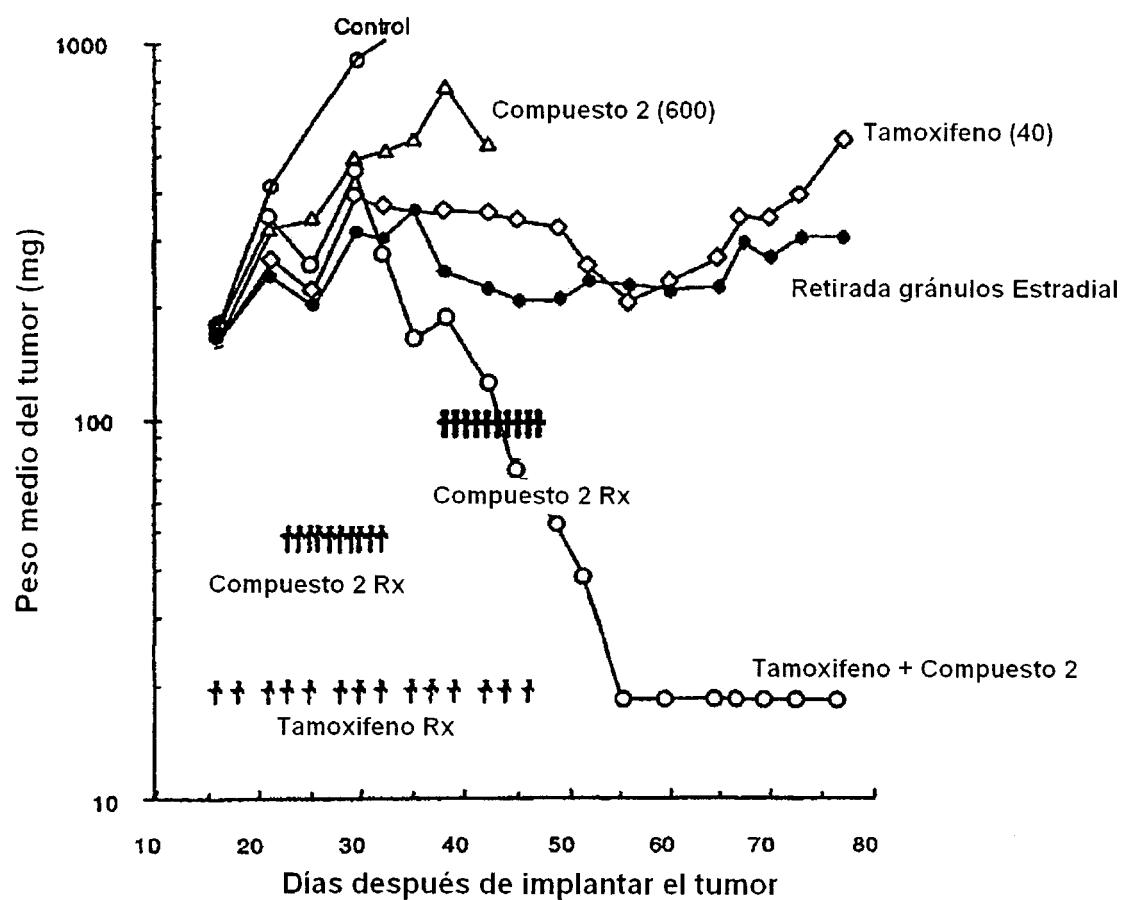


FIG. 20

ES 2 325 055 T3

Combinación Rx Compuesto 2 + Castración

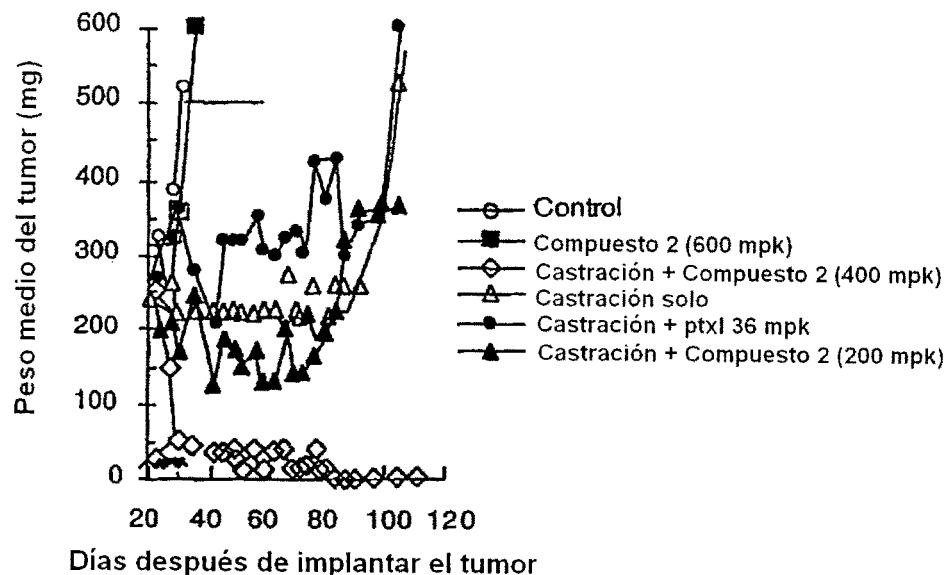


FIG. 21

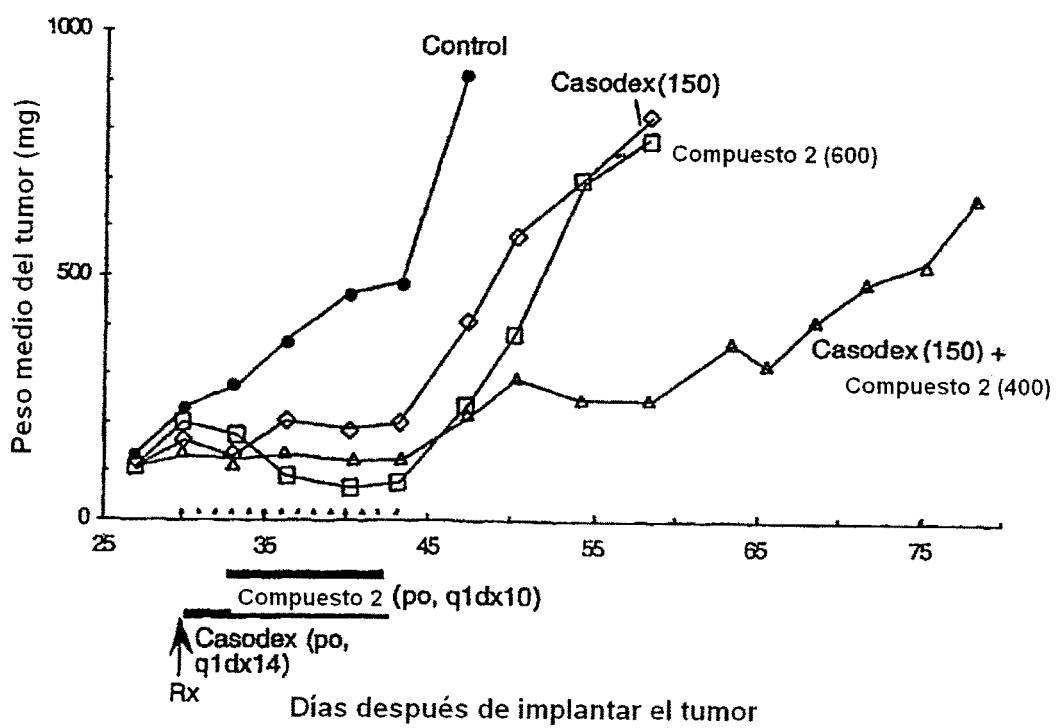


FIG. 22

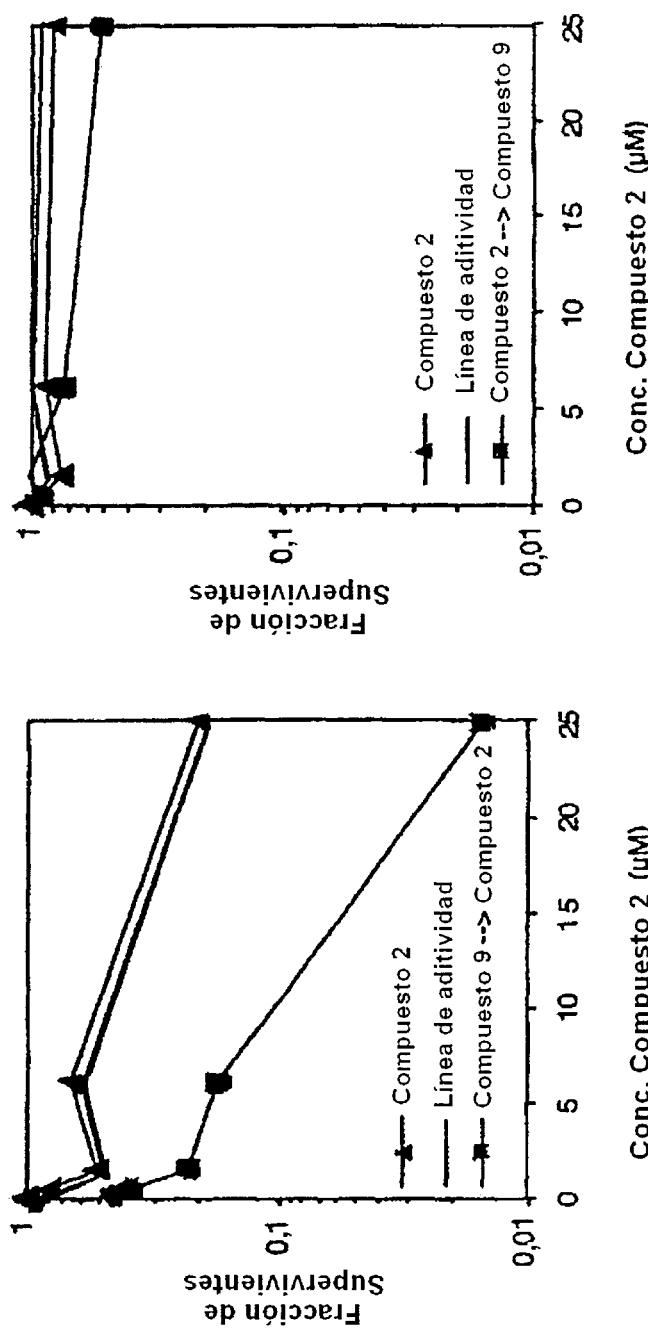


FIG. 23A

FIG. 23B

Conc. Compuesto 2 (μM)

FracCIÓN de Supervivientes

Conc. Compuesto 2 (μM)

FracCIÓN de Supervivientes