



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 778**

51 Int. Cl.:
A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01941917 .5**

86 Fecha de presentación : **04.06.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1289557**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

54 Título: **Composición para el tratamiento del cáncer, que contiene un agente anti-neoplástico y un inhibidor de PDE4.**

30 Prioridad: **06.06.2000 US 209846 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Davis, Stephen, Thomas;**
Dev, Inderjit, Kumar;
Dornsife, Ronna, Ellen y
Gray, John, Gordon

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 267 778 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

Composición para el tratamiento del cáncer, que contiene un agente anti-neoplástico y un inhibidor de PDE4.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un método para tratar un cáncer en un mamífero y a combinaciones farmacéuticas útiles en dicho tratamiento. En particular, el método se refiere a un método de tratamiento de cáncer que incluye la administración de agentes antineoplásticos que afectan de manera adversa a las células progenitoras normales e inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) al mamífero. Estos inhibidores de PDE4 atenúan los efectos secundarios indeseados sobre las células progenitoras normales del mamífero que se producen como resultado de la administración de dicho agente antineoplástico.

En el campo de la oncología, es un objetivo aún no conseguido una quimioterapia eficaz para el tratamiento de cánceres que tenga una toxicidad aceptable para las células normales. En el tratamiento de cánceres se usan numerosos agentes, incluyendo agentes que afectan adversamente a las células progenitoras normales cuando se usan. Una de estas clases de agentes antineoplásticos que tiene un efecto adverso sobre las células progenitoras normales se conoce como agentes antineoplásticos con especificidad de fase. Los agentes antineoplásticos con especificidad de fase tienen actividad contra células que están en el proceso de división celular. Típicamente, estos agentes tienen efecto sobre el ciclo celular en la fase G₁ - el período comprendido entre la mitosis y la síntesis de ADN; S - el período de síntesis de ADN; G₂ - el intervalo premitótico; y/o M - el período de mitosis. Estos agentes no son eficaces en G₀, la fase celular inactiva o de reposo. Por lo tanto, los agentes antineoplásticos con especificidad de fase son activos contra células en el proceso de división celular. Los agentes antineoplásticos con especificidad de fase son más eficaces contra cánceres que tienen una gran fracción de crecimiento, es decir, tumores que tienen un alto porcentaje de células en división. Sin embargo, estos agentes también tienen un efecto adverso sobre tejidos normales que proliferan rápidamente tales como la médula ósea, los folículos pilosos y el epitelio intestinal, lo cual supone un problema. (Véase Goodman Et Gilman's, *The Pharmacologic Basis Of Therapeutics* 9^a Ed., páginas 1230-1232.)

Como se ha indicado anteriormente, la médula ósea y la mucosa epitelial (gastrointestinal y oral) tienen un ciclo celular rápido y son particularmente sensibles a agentes antineoplásticos con especificidad de fase. Por consiguiente, la mielosupresión y la mucositis son los dos efectos secundarios limitantes de la dosis más comunes del tratamiento antineoplástico. La mielosupresión es la supresión de la actividad normal de la médula ósea (hematopoyesis) que finalmente ocasiona una reducción de los glóbulos blancos (neutropenia), plaquetas (trombocitopenia) y/o glóbulos rojos (anemia) en la sangre periférica. Todos estos efectos adversos pueden originar complicaciones para la salud del paciente. Por ejemplo, la neutropenia puede ocasionar susceptibilidad a infecciones bacterianas oportunistas recurrentes y que ponen en peligro la vida. La mucositis es una inflamación debida a lesiones en la mucosa epitelial. La mucositis inducida por terapias antineoplásticas incluye lesiones en la barrera epitelial y la entrada potencial de flora microbiana en la sangre. La neutropenia y la mucositis, si son suficientemente severas, limitan la capacidad de los pacientes de tolerar cursos posteriores de fármacos antineoplásticos (Kim SK, Demitri GD, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10 (2) 377-393, (1996)).

Aunque el tratamiento eficaz de la mucositis sigue siendo una necesidad médica importante aún no satisfecha y este efecto todavía es un riesgo para los pacientes tratados con agentes antineoplásticos, se han utilizado varias técnicas para reducir y/o controlar la mielosupresión. Los pacientes con neutropenia comúnmente se tratan con agentes de rescate tales como factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) para reducir la duración y gravedad de la neutropenia. Aunque se ha demostrado que esta estrategia reduce la neutropenia periférica, no se ha demostrado ningún efecto beneficioso sobre la supervivencia en los pacientes por reducción de la infección o intensificación de la dosis de la quimioterapia (Higa, GD; *Pharmacotherapy*, 18 (6) 1249-1254, (1998); Johnston, E; Crawford, J; *Seminars in Oncology*, 25 (5): 552-561, (1998); Petros, WP; Crawford, J; *Current Opinion in Hematology*, 4 (3): 213-216). Además, ciertas pruebas recientes sugieren que la estimulación por G-CSF induce la proliferación de las células madre supervivientes y los ciclos repetidos de quimioterapia dañan adicionalmente y reducen las reservas de células madre. (van Os, R *et al.*, *Blood*, 92 (6), 1950-1956, (1997); Higa, GD; *Pharmacotherapy*, 18 (6) 1249-1254, (1998); Johnston, E; Crawford, J; *Seminars in Oncology*, 25 (5)552-561, (1998)).

En lugar de estimular la proliferación de células madre dañadas y/o supervivientes, una estrategia superior sería una estrategia de conservación total o parcial de las células normales por quimioprotección. Muchos investigadores han sugerido que las células madre pueden protegerse de las lesiones producidas por radiación y quimioterapia manteniendo dichas células madre en un estado inactivado durante la exposición al fármaco. Numerosos estudios han demostrado que una concentración elevada de AMPc intracelular en ciertos tipos celulares tiene como resultado la supresión de la proliferación y activación celular. (Vairo, G *et al.*, *J Biol Chem*, 265 (6): 2692-2700, (1990); Berridge, MV *et al.*, *Experimental Hematology*, 21:269-276 (1993); Morley, A *et al.*, *Proc Soc Exp Biol Med*, 138: 57-59, (1997); Ralph, RK, *FEBS lett*, 161:1-8). El aumento del nivel de AMPc intracelular también aumenta la supervivencia y vida media de neutrófilos maduros de sangre periférica aparentemente reduciendo la apoptosis natural (Walker, BA *et al.*, *J Immunol*, 158:2926-2931; Rossi, AG, *Biochem Biophys Research Commun*, 217 (3), 892-899 (1995); Niwa, M *et al.* *Euro J Pharmacol* 371, 59-67, (1999)).

En el documento WO9949859 se propuso el agente anti-inflamatorio no esteroideo sulindac, que también es un inhibidor de PDE4, en combinación con el agente anticancerígeno difluorometilornitina, para la prevención/tratamiento

de cánceres caracterizados por la expresión de un Ki-ras activado, y en el documento WO0016621 se describió un inhibidor específico de PDE4 en combinación con agentes quimioterapéuticos como método potencial para tratar la leucemia linfocítica crónica. En el documento WO0178651 se describió un inhibidor antineoplásico de la topoisomerasa I en combinación con un inhibidor de PDE como tratamiento potencial para la neoplasia, mientras que el documento EP-A-1188438 se relacionaba con el uso propuesto de inhibidores de PDE4 para fabricar un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad asociada con un exceso de producción de IL-12.

Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que la elevación de los niveles de AMPc intracelular podría proteger a las células progenitoras y las células madre normales en diversos tejidos de las citotoxicidades producidas por agentes antineoplásicos por medio de la inducción de la detención del ciclo celular y/o por medio de la inhibición de la apoptosis. Las concentraciones intracelulares de AMPc pueden elevarse por varios mecanismos (véase la Figura 1), incluyendo la activación de receptores de superficie que están acoplados a proteínas G a la enzima generadora de AMPc adenil ciclasa (por ejemplo, con prostaglandina E-2 [PGE₂]) 1; el aumento de los niveles de AMPc por medio de la estimulación directa de la adenilato ciclasa (por ejemplo, con forskolina) 2; por tratamiento con un análogo estable de AMPc (por ejemplo dibutil AMPc, 8-CI AMPc u 8-bromo AMPc) 3, o por medio de la inhibición de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE), lo cual reduce la velocidad a la que se cataboliza el AMPc para dar AMP 4.

Las fosfodiesterasas (PDE) constituyen una familia grande y divergente de enzimas que catalizan el catabolismo de AMPc y GMPc para dar AMP y GMP, respectivamente. Hasta la fecha se han identificado once miembros de esta familia basándose en la especificidad del sustrato, propiedades cinéticas, sensibilidad a inhibidores específicos, distribución tisular y secuencias primarias (Manganiello, VC *et al.*, Arch Biochem Biophys, 322 (1): 1-13, (1995);

Fawcett, L *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97(7): 3702-3707 (2000)). El reconocimiento de estas diferencias ha estimulado enormemente el interés en las PDE como fármacos diana. En particular, la PDE específica de AMPc, denominada PDE4, que se encuentra en casi todas las células inmunes e inflamatorias, es una diana atractiva para nuevas terapias antiasmáticas y anti-inflamatorias.

Los presentes inventores han descubierto ahora un nuevo método para tratar cáncer usando una nueva combinación farmacéutica que puede tratar selectivamente cánceres, atenuando al mismo tiempo los efectos secundarios adversos asociados incluyendo mielosupresión y mucositis. La presente invención reconoce el uso de inhibidores de PDE4 como agentes selectivos que podrían proporcionar protección de la mielosupresión y mucositis inducidas por agentes antineoplásicos sin afectar a la eficacia antineoplásica de estos fármacos. La elevación del AMPc por medio de la inhibición de la isoenzima PDE4 ofrece una clara ventaja sobre la inhibición de múltiples isoenzimas PDE porque puede conducir potencialmente a un aumento del AMPc intracelular en las células normales, pero no en las células tumorales. La PDE4 es la isoenzima PDE exclusiva de AMPc encontrada en los neutrófilos y es la isoenzima PDE de AMPc predominante en las células epiteliales. La inhibición selectiva de la PDE4 en neutrófilos o células epiteliales elevaría el nivel intracelular de AMPc en esas células significativamente. Por el contrario, las células tumorales tienen otras isoenzimas PDE de AMPc además de PDE4. Estas isoenzimas adicionales presentes en las células tumorales permitirían catabolizar el AMPc para dar AMP y de esta manera impedir una acumulación del AMPc intracelular aunque se trataran con un inhibidor selectivo de PDE4.

Compendio de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación para el tratamiento de cánceres, que comprende: cantidades terapéuticamente eficaces de

(i) un agente antineoplásico que afecta de manera adversa a las células progenitoras normales después del uso, seleccionado entre paclitaxel, docetaxel, topotecán, irinotecán, 7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilenodioxi-20-camptotecina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, etopósido, tenipósido, fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, 5-azacitidina, gemcitabina, pentostatina, eritrohidroxinoniladenina, fludarabina fosfato y cladribina;

(ii) un inhibidor de PDE4 seleccionado entre ácido cis-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo [Ariflo™], N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopentiloxi-4-metoxibenzamida [piclamiast], (E)-O-{aminocarbonil}oxima de 1-[(3-ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]etanona [filaminast], (+/-)-4-[2-(3-Ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-feniletil]piridina [CDP-840], nitroquazona, rolipram, denbufilina, 8-aza-1-(3-nitrofenil)-3-(4-piridilmetil-2,4-quinazolinadiona) [RS-25344], 1-(3-carbometoxifenil)-3-bencilpirido[2,3d]pirimidina-2,4(1H,3H)diona [CP-77059] y (3S,4S)-3-acetil-[3-(ciclopentiloxi)-4-metiloxi]fenil]-3-metil-pirrolidinacarboxilato de metilo [GI193600X]; y

(iii) un agente eficaz para aumentar las concentraciones intracelulares de AMPc o análogos del mismo seleccionados entre forskolina, dibutilil AMPc, 8-bromo AMPc, terbutalina, albuterol, pirbuterol, bitolterol, metaproterenol, formoterol y salmeterol o una sal de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa diversos mecanismos para aumentar las concentraciones intracelulares de AMPc en las células.

La Figura 2 representa una evaluación por citometría de flujo de células madre CD34⁺ expandidas tratadas con (a) DMSO; (b) rolipram más forskolina seguido de tratamiento con diversas dosis de paclitaxel; y (c) un gráfico de porcentaje de células vivas frente a dosis de paclitaxel con pretratamiento con DMSO o rolipram más forskolina.

Las Figuras 3 (a), (b) y (c) representan la protección de progenitores de neutrófilos con especificidad de fase (CFU-GM) medida por ensayo de formación de colonias, donde las células se tratan con rolipram más forskolina seguido de tratamiento con (a) 5-fluorouracilo, (b) etopósido o (c) paclitaxel.

Las Figuras 4 (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g) representan la protección de progenitores de neutrófilos en múltiples fases medida por un método ELISA basado en células con el antígeno CD15 de neutrófilos (CELISA) en el que las células se tratan con rolipram más forskolina seguido de tratamiento con (a) paclitaxel, (b) 5-fluorouracilo, (c) etopósido, (d) vinblastina, (e) vinorelbina, (f) metotrexato o (g) topotecán.

Las Figuras 5 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) e (i) representan la protección de progenitores de neutrófilos en múltiples fases medida por un método ELISA basado en células con el antígeno CD15 de neutrófilos (CELISA) en el que las células se tratan con (a) ArifloTM, (b) Piclamilast, (c) CDP-840 [GR259653X], (d) CDP-840 [GR259654X], (e) Nitraqazona, (f) Denbufilina, (g) RS-25344 [8-aza-1-(3-nitrofenil)-3-(4-piridilmetil)-2,4-quinazolinadiona], (h) CP-77059 1-(3-carbometoxifenil)-3-bencilpirido[2,3d]pirimidina-2,4(1H,3H)diona o (i) GI193600X [(3S,4S)-3-acetil-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-(metiloxi)fenil]-3-metil-1-pirrolidinacarboxilato de metilo], cada uno de ellos más forskolina, seguido de tratamiento con paclitaxel.

La Figura 6 representa la protección de progenitores de neutrófilos en múltiples fases medida por un método ELISA basado en células con el antígeno CD15 de neutrófilos (CELISA) en el que las células se tratan con ArifloTM más forskolina seguido de tratamiento con topotecán.

Las Figuras 7 (a), (b) y (c) representan la no protección de progenitores de neutrófilos en múltiples fases medida por un método ELISA basado en células con neutrófilos CD15 (CELISA) en el que las células se tratan con rolipram más forskolina seguido de tratamiento con (a) cisplatino, (b) doxorubicina o (c) carboplatino.

Las Figuras 8 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h) representan la ausencia de efecto sobre el efecto antineoplásico de paclitaxel contra la línea tumoral de colon RKO humana ((a) y (c)) o la línea tumoral de colon HT-29 humana ((b) y (d)), o la línea tumoral de mama MDA468 humana ((e) y (g)) o la línea de tumor pulmonar A549 humana ((f) y (h)), donde el crecimiento relativo de las células tumorales se mide con el colorante de proteínas sulforrodamina (SRB) después de que las células se hayan tratado con rolipram más forskolina o ArifloTM más forskolina seguido de tratamiento con paclitaxel 100 nM.

Las Figuras 9 (a) y (b) representan compuestos inhibidores de PDE4, (a) ArifloTM y (b) piclamilast, útiles en la presente invención.

Las Figuras 10 (a) y (b) representan compuestos inhibidores de PDE4, (a) filaminast y (b) CDP-840, útiles en la presente invención.

Las Figuras 11 (a), (b) y (c) representan compuestos inhibidores de PDE4, (a) nitraqazona, (b) denbufilina y (c) rolipram útiles en la presente invención.

La Figura 12 representa el compuesto inhibidor de PDE4 GI193600X, útil en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, la expresión “alquilo” se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a doce átomos de carbono, opcionalmente sustituido con sustituyentes seleccionados entre el grupo que incluye alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, alquilsulfanilo C₁-C₆, alquilsulfenilo C₁-C₆, alquilsulfonilo C₁-C₆, oxo, hidroxilo, mercapto, amino opcionalmente sustituido con alquilo, carboxi, carbamoilo opcionalmente sustituido con alquilo, aminosulfonilo opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que incluye alquilo, nitro, ciano, halógeno y perfluoroalquilo inferior, permitiéndose múltiples grados de sustitución. Los ejemplos de “alquilo” como se usa en este documento incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-butilo, n-pentilo, isobutilo, isopropilo y similares.

Como se usa en este documento, la expresión “alcoxi” se refiere al grupo R_aO-, donde R_a es alquilo.

Como se usa en este documento, la expresión “arilo” se refiere a un resto aromático de 6 a 10 carbonos. Los ejemplos de “arilo” como se usa en este documento incluyen fenilo, piridilo, pirimidilo, piridazilo, pirazilo y triazilo.

ES 2 267 778 T3

Como se usa en este documento, la expresión “ariloxi” se refiere al grupo R_aO- , donde R_a es arilo.

Como se usa en este documento, la expresión “halógeno” se refiere al grupo flúor, cloro, bromo y yodo.

5 Como se usa en este documento, la expresión “neoplasma” se refiere a un crecimiento anormal de células o tejidos y se entiende que incluye crecimientos benignos, es decir, no cancerosos, y crecimientos malignos, es decir, cancerosos. La expresión “neoplásico” significa o se refiere a un neoplasma.

10 Como se usa en este documento, se entiende que la expresión “agente” indica una sustancia que produce un efecto deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero, ser humano u otro sujeto. Por consiguiente, la expresión “agente antineoplásico” pretende indicar una sustancia que produce un efecto antineoplásico en un tejido, sistema, animal, mamífero, ser humano u otro sujeto. También se entiende que un “agente” puede ser un solo compuesto o una combinación o composición de dos o más compuestos.

15 Como se usa en este documento, la expresión “solvato” es un complejo de estequiometría variable formado por un soluto y un disolvente. Los disolventes, a modo de ejemplo, incluyen agua, metanol, etanol o ácido acético.

20 Como se usa en este documento, la expresión “células progenitoras” se refiere a células parentales o precursoras que típicamente proliferan rápidamente y dan lugar a células que funcionan en un tejido, sistema, animal, mamífero, ser humano u otro sujeto. Estas células progenitoras incluyen células madre de médula ósea que dan lugar a eritrocitos, leucocitos y plaquetas; progenitores epiteliales incluyendo células madre epiteliales del tracto intestinal, y progenitores de folículos pilosos que dan lugar al pelo.

25 Como se usa en este documento, la expresión “progenitor con especificidad de fase” se refiere a progenitores/precursores que pueden evaluarse mediante un ensayo de formación de colonias, por ejemplo, CFU-GM, un progenitor de macrófagos y granulocitos tempranos (inmaduros). Como se usa en este documento, la expresión “progenitores de múltiples fases” se refiere a una mezcla de progenitores/precursores tempranos y tardíos (maduros) que aún pueden dividirse (no están diferenciados terminalmente) y producir células hijas.

30 Como se usa en este documento, la expresión “compuesto antineoplásico con especificidad de fase” se refiere a compuestos antineoplásicos que tienen especificidad de ciclo celular. Es decir, los compuestos actúan en las células o afectan a las células en fases específicas del ciclo celular. Por ejemplo, existen aproximadamente seis docenas de productos aprobados para el tratamiento de malignidades. Muchos de los agentes antineoplásicos existentes comparten un mecanismo de acción común y pueden agruparse. Estos grupos incluyen agentes alquilantes tales como melfalán, clorambucilo, ciclofosfamida, mecloretamina, hexametilmelamina, busulfán, carmustina, lomustina y dacarbazina; antimitóxicos tales como 5-fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina y tioguanina; agentes antimetabólicos tales como paclitaxel, vinblastina, vincristina; inhibidores de topoisomerasa I tales como camptotecina y derivados de camptotecina; inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorrubicina; y complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino. Estos agentes antineoplásicos pueden inducir efectos citotóxicos de una manera específica del ciclo celular, es decir, pueden tener especificidad de fase, o pueden unirse al ADN y actuar de manera no específica del ciclo celular, es decir, pueden no ser específicos del ciclo celular (véase la Tabla 1).

45 Como se usa en este documento, la expresión “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal, mamífero, ser humano u otro sujeto que se persigue por un investigador o médico. Además, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, tiene como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejoría de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de progresión de una enfermedad o trastorno, y también incluye cantidades eficaces para mejorar la función fisiológica normal.

50 En la presente invención se utiliza un agente antineoplásico que afecta de manera adversa a las células progenitoras normales. Estos efectos adversos incluyen mielosupresión, mucositis y alopecia.

55 Son de especial interés los agentes antineoplásicos con especificidad de fase. Los agentes antineoplásicos con especificidad de fase típicos incluyen diterpenoides, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, antimetabólicos y camptotecinas.

60 Los diterpenoides, que se obtienen a partir de fuentes naturales, son agentes anticancerígenos con especificidad de fase que actúan en las fases G_2/M del ciclo celular. Se cree que los diterpenoides estabilizan la subunidad β -tubulina de los microtúbulos por unión con esta proteína. Después, parece ser que se inhibe el desmontaje de la proteína deteniéndose la mitosis y produciéndose muerte celular. Los ejemplos de diterpenoides incluyen, pero sin limitación, paclitaxel y su análogo docetaxel.

65 El paclitaxel, $5\beta,20$ -epoxi- $1,2\alpha,4,7\beta,10\beta,13\alpha$ -hexa-hidroxitax- 11 -en- 9 -ona $4,10$ -diacetato 2 -benzoato 13 -éster con $(2R,3S)$ - N -benzoil- 3 -fenilisosserina; es un producto diterpeno natural aislado del tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* y está disponible en el mercado como una solución inyectable TAXOL™. Es un miembro de la familia de terpenos conocida como taxanos. Se aisló por primera vez en 1971 por Wani *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 93:2325, (1971), que caracterizó su estructura por métodos químicos y de cristalografía de rayos X. Un mecanismo para su actividad

se refiere a la capacidad del paclitaxel de unirse a tubulina, inhibiendo de esta manera el crecimiento de células cancerosas. Schiff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1561-1565 (1980); Schiff *et al.*, Nature, 277: 665-667 (1979); Kumar, J. Biol. Chem, 256: 10435-10441 (1981). Como revisión de la síntesis y actividad anticancerígena de algunos derivados de paclitaxel véase: D. G. I. Kingston *et al.*, Studies in Organic Chemistry vol. 26, titulado "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P.W. Le Quesne, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1986) páginas 219-235.

El paclitaxel se ha aprobado para uso clínico en el tratamiento del cáncer de ovario refractario en los Estados Unidos (Markman *et al.*, Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire *et al.*, Ann. Intern. Med., 111:273,1989) y para el tratamiento del cáncer de mama (Holmes *et al.*, J. Nat. Cancer Inst., 83:1797,1991.) Es un candidato potencial para el tratamiento de neoplasmas en la piel (Einzig *et al.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46) y de carcinomas de cabeza y cuello (Forastire *et al.*, Sem. Oncol., 20:56, 1990). El compuesto también muestra potencial para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística (Woo *et al.*, Nature, 368:750. 1994), cáncer de pulmón y malaria. El tratamiento de pacientes con paclitaxel ocasiona supresión de médula ósea (múltiples linajes celulares, Ignoff, R.J. *et al.*, Cancer Chemotherapy Pocket Guide 1998) relacionada con la duración de la dosificación por encima de una concentración umbral (50 nM) (Kearns, CM. *et al.*, Seminars in Oncology, 3(6) p. 16-23, 1995).

El docetaxel, (2R,3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, N-*terc*-butil éster, 13-éster con 5 β -20-epoxi-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -hexahidroxitax-11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, trihidrato; está disponible en el mercado como una solución inyectable como TAXOTERE™. El docetaxel está indicado para el tratamiento de cánceres de mama. El docetaxel es un derivado semisintético del paclitaxel *q.v.*, preparado usando un precursor natural, 10-desacetil-bacatina III, extraído a partir de la aguja del tejo europeo. La toxicidad limitante de la dosis del docetaxel es la neutropenia.

Los alcaloides de la vinca son agentes antineoplásicos con especificidad de fase derivados de la vincapervinca. Los alcaloides de la vinca actúan en la fase M (mitosis) del ciclo celular por medio de la unión específica a la tubulina. Por consiguiente, la molécula de tubulina unida no puede polimerizarse para producir microtúbulos. Se cree que la mitosis se detiene en la metafase produciéndose después muerte celular. Los ejemplos de alcaloides de la vinca incluyen vinblastina, vincristina y vinorelbina.

La vinblastina, sulfato de vincalocoblastina, está disponible en el mercado como VELBAN™ como una solución inyectable. Aunque tiene una posible indicación como terapia de segunda línea de diversos tumores sólidos, principalmente está indicada en el tratamiento de cáncer testicular y diversos linfomas incluyendo enfermedad de Hodgkin; y linfomas linfocíticos e histiocíticos. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la dosis de la vinblastina.

La vincristina, vincalocoblastina, 22-oxo-, sulfato, está disponible en el mercado como ONCOVIN™ como una solución inyectable. La vincristina está indicada para el tratamiento de leucemias agudas y también ha encontrado utilidad en regímenes de tratamiento para linfomas malignos de Hodgkin y no Hodgkin. La alopecia y los efectos neurológicos son los efectos secundarios más comunes de la vincristina y, en una menor medida, se producen mielosupresión y efectos de mucositis gastrointestinal.

La vinorelbina, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-C'-norvincalocoblastina [R-(R*,R*)-2,3-dihidroxitaxanodioato (1:2) (sal)], disponible en el mercado como una solución inyectable de tartrato de vinorelbina (NAVELBINE™), es un alcaloide de la vinca semisintético. La vinorelbina está indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, tales como cisplatino, en el tratamiento de diversos tumores sólidos, particularmente de cáncer macrocítico de pulmón, cáncer de mama avanzado y cáncer de próstata refractario hormonal. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la dosis más común de la vinorelbina.

Las epipodofilotoxinas son agentes antineoplásicos con especificidad de fase derivados de la mandrágora. Las epipodofilotoxinas típicamente afectan a células en la fase S y G₂ del ciclo celular formando un complejo ternario con la topoisomerasa II y el ADN produciendo roturas de las cadenas de ADN. Las roturas de las cadenas se acumulan y se produce muerte celular. Los ejemplos de epipodofilotoxinas incluyen, pero sin limitación, etopósido y tenipósido.

El etopósido, 4'-desmetil-epipodofilotoxina 9[4,6-0-(R)-etilideno- β -D-glucopiranosido], está disponible en el mercado como una solución inyectable o cápsulas como VePESID™ y se conoce comúnmente como VP-16. El etopósido está indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de cáncer testicular y de cánceres macrocíticos de pulmón. La mielosupresión es el efecto secundario más común del etopósido. La incidencia de leucopenia tiende a ser más severa que la trombocitopenia.

El tenipósido, 4'-desmetil-epipodofilotoxina 9[4,6-0-(R)-tenilideno- β -D-glucopiranosido], está disponible en el mercado como una solución inyectable como VUMON™ y se conoce comúnmente como VM-26. El tenipósido está indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de leucemias agudas en niños. La mielosupresión es el efecto secundario limitante de la dosis más común del tenipósido. El tenipósido puede inducir tanto leucopenia como trombocitopenia.

Los agentes antineoplásicos antimetabolito son agentes antineoplásicos con especificidad de fase que actúan en la fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular inhibiendo la síntesis de ADN o inhibiendo la síntesis de bases de purina o pirimidina y limitando de esta manera la síntesis de ADN. Por consiguiente, la fase S no avanza y se produce

ES 2 267 778 T3

muerte celular. Los ejemplos de agentes antineoplásicos antimetabolito incluyen fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina y tioguanina.

5 El 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2,4-(1H,3H)-pirimidinadiona, está disponible en el mercado como fluorouracilo. La administración de 5-fluorouracilo conduce a la inhibición de la síntesis de timidilato y también se incorpora tanto en el ARN como en el ADN. El resultado típicamente es la muerte celular. El 5-fluorouracilo está indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de carcinomas de mama, colon, recto, estómago y páncreas. La mielosupresión y la mucositis son los efectos secundarios limitantes de la dosis del 5-fluorouracilo. Otros análogos de fluoropirimidina incluyen 5-fluoro desoxiuridina (floxuridina) y 5-fluorodesoxiuridina
10 monofosfato.

15 La citarabina, 4-amino-1 β -D-arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona, está disponible en el mercado como CYTOSAR-UTM y se conoce comúnmente como Ara-C. Se cree que la citarabina presenta especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo el alargamiento de la cadena de ADN por la incorporación terminal de citarabina en la cadena de ADN en crecimiento. La citarabina está indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de la leucemia aguda. Otros análogos de citidina incluyen 5-azacitidina y 2',2'-difluorodesoxicidina (gemcitabina). La citarabina induce leucopenia, trombocitopenia y mucositis.

20 La mercaptopurina, 1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona monohidrato, está disponible en el mercado como PURINETHOLTM. La mercaptopurina presenta especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la síntesis de ADN por un mecanismo aún no especificado. La mercaptopurina está indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de la leucemia aguda. La mielosupresión y la mucositis gastrointestinal son efectos secundarios esperados de la mercaptopurina a altas dosis. Un análogo útil de la mercaptopurina es azatioprina.
25

30 La tioguanina, 2-amino-1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona, está disponible en el mercado como TABLOIDTM. La tioguanina presenta especificidad de fase celular en la fase S inhibiendo la síntesis de ADN por un mecanismo no especificado hasta ahora. La tioguanina está indicada como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento de la leucemia aguda. El efecto secundario limitante de la dosis más común de la administración de tioguanina es mielosupresión, incluyendo leucopenia, trombocitopenia y anemia. Sin embargo, pueden producirse efectos secundarios gastrointestinales y pueden ser limitantes de la dosis. Otros análogos de purina incluyen pentostatina, eritrohidroxinoniladenina, fludarabina fosfato y cladribina.

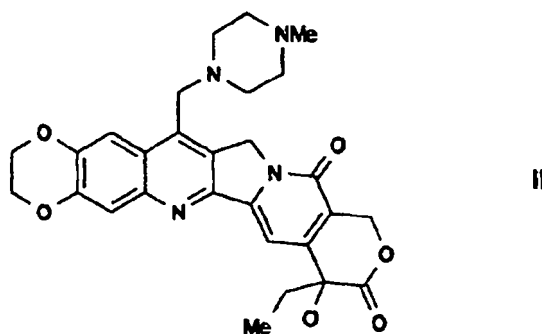
35 El metotrexato, ácido N-[4[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoi]l]-L-glutámico está disponible en el mercado como metotrexato sódico. El metotrexato presenta efectos con especificidad de fase celular, específicamente en la fase S, inhibiendo la síntesis, reparación y/o replicación del ADN por medio de la inhibición de la ácido dihidrofólico reductasa que se requiere para la síntesis de nucleótidos de purina y timidilato. El metotrexato está indicado como un solo agente o en combinación con otros agentes de quimioterapia en el tratamiento del coriocarcinoma, leucemia meníngea, linfoma no Hodgkin y carcinomas de la mama, cabeza, cuello, ovario y vejiga. La mielosupresión (leucopenia, trombocitopenia y anemia) y la mucositis son efectos secundarios esperados de la administración de metotrexato.
40

45 Las camptotecinas, incluyendo la camptotecina y derivados de camptotecina, son inhibidores de la topoisomerasa I. Se cree que la actividad citotóxica de las camptotecinas está relacionada con su actividad inhibidora de la topoisomerasa I. Los ejemplos de camptotecinas incluyen topotecán, irinotecán y las diversas formas ópticas de 7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilenodioxi-24-camptotecina.

50 El topotecán HCl, monohidrocloruro de (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14(4H,12H)-diona, está disponible en el mercado como una solución inyectable HYCAMTINTM. El topotecán es un derivado semisintético de camptotecina que se une al complejo topoisomerasa I - ADN e impide el religamiento de rupturas en una sola cadena del ADN producidas por la topoisomerasa I. Se cree que la citotoxicidad se produce como resultado de rupturas irreparables en la doble cadena causadas por la interacción del complejo ternario topoisomerasa I : ADN : topotecán con enzimas de la replicación. El topotecán está indicado para el tratamiento del carcinoma metastásico del ovario y del cáncer microcítico de pulmón. El efecto secundario limitante de la dosis del topotecán HCl es mielosupresión, principalmente neutropenia.
55

60 El irinotecán HCl, hidrocloruro de (4S)-4,11-dietil-hidroxi-9[(4-piperidinopiperidino)carboniloxi]-1H-pirano [3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14(4H,12H)-diona, está disponible en el mercado como la solución inyectable CAMPTOSARTM. El irinotecán es un derivado de la camptotecina que se une, junto con su metabolito activo SN-38, al complejo topoisomerasa I - ADN. Se cree que se produce citotoxicidad como resultado de rupturas irreparables en la doble cadena causadas por la interacción del complejo ternario topoisomerasa I : ADN : irinotecán o SN-38 con enzimas de la replicación. El irinotecán está indicado para el tratamiento del cáncer metastásico del colon o recto. Los efectos secundarios limitantes de la dosis del irinotecán HCl son mielosupresión, incluyendo neutropenia, y efectos GI, incluyendo diarrea.
65

También tiene interés el derivado de camptotecina de fórmula II que se presenta a continuación, actualmente en desarrollo, incluyendo la mezcla racémica (R,S) así como los enantiómeros R y S:



15 conocido por el nombre químico "7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilenodioxo-20(R,S)-camptotecina (mezcla racémica) o "7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilenodioxo-20(R)-camptotecina (enantiómero R) o "7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilenodioxo-20(S)-camptotecina (enantiómero S). En las Patentes de Estados Unidos N° 6.063.923; 5.342.947; 5.559.235; 5.491.237 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos en trámite N° 08/977.217 presentada el 24 de noviembre de 1997, se describe dicho compuesto así como compuestos relacionados, incluyendo métodos para su fabricación.

En una realización preferida, el agente antineoplásico con especificidad de fase es paclitaxel. En una realización preferida alternativa, el agente antineoplásico con especificidad de fase es topotecán.

25 Como se ha mencionado anteriormente, la combinación de la presente invención también incluye un agente inhibidor de PDE4 específico. Se describen inhibidores de PDE4, por ejemplo, en "PDE4 inhibitors 1998" Norman, Peter, Exp. Opin. Ther. Patents (1998) 8(7); y "Chronic Pulmonary inflammation and Other Therapeutic Applications of PDEIV Inhibitors", Stafford, Jeffrey A. and Feldman, Paul L, Ch. 8 Annual Reports In Medicinal Chemistry Ch. 8, 71-80 (1996).

30 De los compuestos de Fórmula I tiene un interés particular el inhibidor de PDE4 ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo. Este compuesto también se ha denominado Ariflo™ y se representa en la Figura 9(a). En la Patente de Estados Unidos N° 5.643.946, incorporándose dicha patente en este documento como referencia en la medida en que enseña compuestos inhibidores de PDE4 y síntesis de los mismos.

Otro inhibidor de PDE4 que puede emplearse de forma útil en la presente invención es piclamilast, es decir, N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopentiloxi-4-metoxibenzamida, representado en la Figura 9(b). En la Solicitud de Patente Internacional WO92/12961 y WO 97/48697 se describen piclamilast y compuestos relacionados, así como las síntesis de los mismos. Otro inhibidor de PDE4 que puede emplearse de forma útil en la presente invención es filaminast, (E)-O-{aminocarbonil}oxima de 1-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil] etanona, que se representa en la Figura 10(a). En la Solicitud de Patente Europea EP 470805A1 se describen filaminast y compuestos relacionados, así como la síntesis de los mismos.

45 Otro grupo de compuestos inhibidores de PDE4 que pueden emplearse de forma útil en la presente invención es (+/-)-4-[2-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-feniletil]piridina (CDP-840), que se representa en la Figura 10(b). En las Solicitudes de Patente Internacional WO 94/14742; 97/23460; 97/23461; 97/38976; 97/42172; y 98/12178 se describe este compuesto, así como su síntesis.

50 Otros inhibidores de PDE4 que pueden utilizarse en la presente invención incluyen:

(i) nitroquazona, representada en la Figura 11 (a), y derivados de nitroquazona, describiéndose estos compuestos en el documento WO 93/07146 incluyendo las síntesis de los mismos

55 (ii) denbufilina, es decir, 7-acetonil,1,3-dibutilxantina, fabricada por SmithKline Beecham y representada en la Figura 11 (b);

(iii) rolipram, representado en la Figura 11 (c);

60 RS-25344 [8-aza-1-(3-nitrofenil)-3-(4-piridilmetil)-2,4-quinazolinadiona], y compuestos relacionados, describiéndose estos compuestos en los documentos WO 93/07146 y 93/19068 incluyendo las síntesis de los mismos;

65 (v) CP-77059 1-(3-carbometoxifenil)-3-bencilpirido[2,3d]pirimidina-2,4(1H,3H)diona y compuestos relacionados, describiéndose estos compuestos en los documentos WO 96/40636 y 97/05105 incluyendo la síntesis de los mismos; y

(vi) GI 193600X [(3S,4S)-3-acetil-4-[3(ciclopentiloxi)-4-(metiloxi)fenil]-3-metil-1-pirrolidinacarboxilato de metilo] disponible en Glaxo Wellcome, Inc., representado en la Figura 12.

En una realización, el inhibidor de PDE4 es el ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo; N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopentiloxi-4-metoxibenzamida; (E)-O-{aminocarbonil}oxima de 1-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]etanona; o (+/-)-4-[2-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-feniletil]piridina.

El rolipram, un agente inhibidor de PDE4, cuando se usó solo tuvo poco efecto protector en los ensayos basados en células utilizados en este documento. Esto concuerda con la ausencia del efecto de rolipram cuando se usa solo sobre diversas funciones de los neutrófilos (Au B-T *et al. British J Pharmacol* 123: 1260-1266, (1998); Nielsen *et al. J Allergy Clin Immunol*, 86: 801-808, (1990)). Sin embargo, se observó una sinergia significativa entre los inhibidores de PDE4 y los agentes que activan la adenilato ciclasa y elevan los niveles intracelulares de AMPc, por ejemplo, forskolina (Nicholson, CD; Shahid, M. *Pulm Pharmacol*, 7:1-17 (1994); Au B-T *et al. British J Pharmacol*, 123:1260-1266, (1998); Nielsen *et al. J Allergy Clin Immunol*, 86: 801-808, (1990)). Aunque sin el deseo de limitarse por ninguna teoría, los presentes inventores creen que, en pacientes humanos con cáncer puede no ser necesario un activador de la adenilato ciclasa, porque en estos pacientes están elevados los niveles séricos del activador de la adenilato ciclasa prostaglandina E2 (PGE₂) (Young MR, *Cancer Met. Rev.*, 13: 337-348 (1994); Uotila P., *Cancer Immunol Immunother*, 43: 1-9, (1996); Baxevanis CN *et al. Eur J Cancer*, 33 (8): 1202-1208, (1997)), contribuyendo de este modo a la elevación de los niveles de AMPc.

La presente invención incluye adicionalmente un agente eficaz para elevar las concentraciones intracelulares de AMPc o análogos del mismo junto con el agente contra el cáncer con especificidad de fase y el agente inhibidor de PDE4. Los compuestos adecuados incluyen agentes que (1) aumentan los niveles de AMPc activando receptores de superficie que son proteínas G_s acopladas a la enzima generadora de AMPc adenilil ciclasa 1; y (2) aumentan los niveles de AMPc estimulando directamente la adenilato ciclasa, incluyendo forskolina y análogos estables de AMPc incluyendo dibutiril AMPc; y 8-bromo-AMPc.

En una realización, el agente, que es eficaz para elevar los niveles intracelulares de AMPc se selecciona entre terbutalina, albuterol, pirbuterol, bitolterol, metaproterenol, formoterol y salmeterol o una sal de los mismos.

La terbutalina, sulfato de alcohol (+/-)- α [(*terc*-butilamino)metil]-3,5-dihidrobencílico (sal 2:1), está disponible en el mercado como BRETHINE™. La terbutalina se describe en la Patente de Estados Unidos 3.938.838. El albuterol, sulfato de α^1 [(*terc*-butilamino) metil] 4-hidroxi-*m*-xileno- α,α' -diol racémico (sal 2:1), está disponible en el mercado como PROVENTIL™. El pirbuterol, sal monoacetato de (R,S) α^6 -[(1,1-dimetiletil)amino]metil]-3-hidroxi-2,6-piridinadimetanol, está disponible en el mercado como MAXAIR™. El bitolterol, sal metanosulfonato de 4-[2-[(1,1-dimetiletil)amino]-1-hidroxietil]-1,2-fenileno-4-metilbenzoato, está disponible en el mercado como TORNALATE™. El metaproterenol, sulfato de 1-(3,5-dihidroxifenil)-2-isopropilaminoetanol, está disponible en el mercado como ALUPENT™. El metaproterenol se describe en la Patente de Estados Unidos 3.341.594. El formoterol, [(R*,R*)-(+/-)-N-[2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2[[2-(4-metoxifenil)-1-metiletil]etil]fenil]formamida], se describe en la Patente de Estados Unidos 3.994.974.

El salmeterol, 4-hidroxi- α^1 (((6-(4-fenilbutoxi)hexil)amino)metil)-1,3-bencenodimetanol, preferiblemente la sal 1-hidroxi-2-naftalenocarboxilato (xinasoato), está disponible en el mercado como SEREVENT™ y se describe en el documento GB 2140800.

En otra realización, el agente antineoplásico con especificidad de fase es paclitaxel, el inhibidor de PDE4 es ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo y el agente eficaz para elevar los niveles intracelulares de AMPc es salmeterol o una sal del mismo.

En una realización alternativa, el agente antineoplásico con especificidad de fase es topotecán, el inhibidor de PDE4 es el ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo y el agente eficaz para elevar los niveles intracelulares de AMPc es salmeterol o una sal del mismo.

El animal que necesita tratamiento usando la combinación de la presente invención es un mamífero, tal como un ser humano.

Cuando se utiliza, el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares se administra concomitantemente con el compuesto inhibidor de PDE4 y antes o después de la administración del agente antineoplásico. Como alternativa, el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares se administra concomitantemente con el compuesto inhibidor de PDE4 y el agente antineoplásico. Como alternativa, el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares se administra secuencialmente con el agente antineoplásico con especificidad de fase y el agente inhibidor de PDE4 en cualquier secuencia y en cualquier periodo de tiempo que sea adecuado para conseguir el efecto terapéutico deseado. El agente inhibidor de PDE4 y el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares se administran con el agente antineoplásico con especificidad de fase de tan manera que se consiga un efecto preventivo o de mejora sobre los efectos secundarios que de otro modo surgirían en ausencia del agente inhibidor de PDE4 y el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares.

Los agentes antineoplásicos, los agentes inhibidores de PDE4 y los agentes que son eficaces para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía apropiada. Las vías apropiadas incluyen la vía oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal, y epidural). Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con el estado del destinatario de la combinación. También se apreciará que cada uno de los agentes/activadores administrados puede administrarse por la misma vía o por vías diferentes y que uno o más de los agentes antineoplásicos con especificidad de fase, el agente inhibidor de PDE4 y el inhibidor de la adenilato ciclasa pueden combinarse en una composición/formulación farmacéutica.

La presente invención también emplearse con otros tratamientos contra el cáncer. En particular, en terapia antineoplásica, se prevé la terapia de combinación con otros agentes quimioterapéuticos, hormonales, anticuerpos así como con tratamientos quirúrgicos y/o de radiación diferentes a los mencionados anteriormente. De esta manera, las terapias de combinación de la invención incluyen la administración de al menos un agente antineoplásico y al menos un agente inhibidor de PDE4 y al menos un agente que sea eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares, así como el uso opcional de otros agentes terapéuticos incluyendo otros agentes antineoplásicos. Estos agentes de combinación pueden administrarse juntos con o por separado y, cuando se administran por separado, se pueden administrar simultánea o secuencialmente en cualquier orden, cercanos o alejados en el tiempo. Las cantidades del compuesto o compuestos y el otro u otros agentes farmacéuticamente activos y el ritmo relativo de administración se seleccionarán para conseguir el efecto terapéutico combinado deseado.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas o comprimidos; polvos o granulados; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite.

Por ejemplo, para administración oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral, no tóxico y farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se preparan triturando el compuesto a un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico triturado de forma similar, tal como un carbohidrato comestible, por ejemplo, almidón o manitol. También puede estar presente un agente aromatizante, conservante, dispersante o colorante.

Las cápsulas se fabrican preparando una mezcla de polvo como se ha descrito anteriormente, y rellenando las cubiertas de gelatina formadas. Pueden añadirse deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato cálcico o polietilenglicol sólido a la mezcla de polvo antes de la operación de rellenado. También puede añadirse un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato cálcico o carbonato sódico para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiera la cápsula.

Además, cuando se desea o es necesario, también pueden incorporarse en la mezcla agentes aglutinantes, lubricantes, disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, tales como glucosa o betalactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen almidón, metilcelulosa, agar, bentonita y goma xantana. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla de polvo, granulando o triturando, añadiendo un lubricante y un disgregante y prensando la mezcla para proporcionar comprimidos. Una mezcla de polvo se prepara mezclando el compuesto, convenientemente triturado, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente y, opcionalmente, con un aglutinante tal como carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, un agente para retardar la disolución tal como parafina, un acelerador de la reabsorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla de polvo puede granularse humedeciéndose con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de goma arábiga o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándose a pasar a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla de polvo puede procesarse a través de una máquina de preparación de comprimidos y los bloques formados de manera defectuosa resultantes pueden romperse en gránulos. Los gránulos pueden lubricarse para evitar la adhesión a los troqueles que forman los comprimidos mediante la adición de ácido esteárico, una sal estearato, talco o aceite mineral. La mezcla lubricada después se comprime en comprimidos. Los compuestos de la presente invención también pueden combinarse con un vehículo inerte fluido y comprimirse para proporcionar comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulación o trituración. Puede proporcionarse un recubrimiento protector transparente u opaco consistente en un recubrimiento sellante de goma laca, un recubrimiento de azúcar o material polimérico y un recubrimiento pulido de cera. Pueden añadirse colorantes a estos recubrimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Pueden prepararse fluidos orales tales como soluciones, jarabes y elixires en una forma de dosificación unitaria de modo que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes pueden prepararse disolviendo el compuesto en una solución acuosa convenientemente aromatizada, mientras que los elixires se preparan por medio del uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones pueden formularse dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. También pueden añadirse solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservantes, aditivos aromatizantes tales como aceite de menta o edulcorantes naturales o sacarina u otros edulcorantes artificiales.

ES 2 267 778 T3

Cuando sea apropiado, las formulaciones de dosificación unitaria para administración oral pueden microencapsularse. La formulación también puede prepararse para prolongar o mantener la liberación, tal como por ejemplo recubriendo o incluyendo el material en forma de partículas en polímeros, ceras o similares.

5 Los agentes de acuerdo con la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de liberación de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

10 Los agentes de acuerdo con la presente invención también pueden suministrarse por medio del uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales con los que se acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármacos dirigibles. Estos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxiopropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol u óxido de polietileno-polilisina sustituido con restos de palmitoílo. Además, los compuestos pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poli-épsilon caprolactona, ácido polihidroxiбутírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

15 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del destinatario durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el ingrediente activo puede suministrarse desde el parche por iontoforesis como se describe en líneas generales en *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

20 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites.

25 Para tratamientos de los ojos u otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas a los ojos incluyen gotas oftálmicas en las que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente en un disolvente acuoso.

35 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y colutorios.

40 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden presentarse como supositorios o enemas.

45 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal en las que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micrómetros, que se administra del modo en el que se toma rapé, es decir, por inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para administración como una pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo.

50 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración por inhalación incluyen polvos o nieblas de partículas finas que pueden generarse por medio de diversos tipos de aerosoles, nebulizadores o insufladores presurizados dosificadores.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

55 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas y no acuosas para inyección que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de una sola dosis o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados herméticamente, y pueden almacenarse en condiciones de secado por congelación (liofilizadas) que requieren sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

60 Debe entenderse que, además de los ingredientes particulares mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Las sales incluidas en la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los

ES 2 267 778 T3

compuestos de esta invención que se preparan generalmente haciendo reaccionar una base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado o haciendo reaccionar el ácido con una base orgánica o inorgánica adecuada.

5 La combinación farmacéutica incluye un agente antineoplásico, un inhibidor de PDE4 y un agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares. El agente antineoplásico, el inhibidor de PDE4 y el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares son como se ha descrito anteriormente. En otra realización, el agente antineoplásico con especificidad de fase es paclitaxel, el inhibidor de PDE4 es el ácido *cis*-4-ciano-4-[3(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo y si se incluye el agente eficaz para elevar los niveles intracelulares de AMPc, es salmeterol o una sal del mismo. En otra realización adicional, 10 el agente antineoplásico con especificidad de fase es topotecán, el inhibidor de PDE4 es el ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal de mismo y si se incluye el agente eficaz para elevar los niveles intracelulares de AMPc es salmeterol o una sal del mismo.

15 La presente invención proporciona una combinación de tratamiento contra el cáncer mediante la cual se atenúan los efectos secundarios asociados con los agentes antineoplásicos que afectan de manera adversa a las células progenitoras normales. Los especialistas en la técnica entenderán que los cánceres específicos tratados dependerán de los agentes antineoplásicos específicos usados. Por lo tanto, los efectos secundarios esperados también pueden variar dependiendo de la dosis, vías y ciclos de agentes antineoplásicos utilizados para tratar un tumor específico. Los efectos secundarios típicos que pueden atenuarse incluyen, pero sin limitación, mielosupresión incluyendo neutropenia, trombocitopenia o anemia; mucositis; y alopecia. En una realización preferida, el efecto secundario atenuado es mielosupresión o 20 mucositis. En una realización más preferida, el efecto secundario atenuado es neutropenia.

Como se ha indicado, las cantidades terapéuticamente eficaces del agente antineoplásico específico, el inhibidor de PDE4 y el agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares se administran a un mamífero, 25 Típicamente, la cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los agentes de la presente invención dependerá de varios factores que incluyen, por ejemplo, la edad y peso del mamífero, la afección precisa que requiere tratamiento, la gravedad de la afección, la naturaleza de la formación y la vía de administración. Finalmente, la cantidad terapéuticamente eficaz dependerá del criterio del médico o veterinario que está a cargo del caso.

30 Típicamente, el agente antineoplásico se administrará en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal del destinatario (mamífero) por día y, más habitualmente, en el intervalo de 1 a 10 mg/kg de peso corporal por día. Las dosificaciones diarias aceptables del inhibidor de PDE4 para prevenir/reducir la gravedad de los efectos secundarios inducidos por la administración de un agente antineoplásico con especificidad de fase pueden ser de aproximadamente 0,1 aproximadamente 1000 mg/día, y preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 100 mg/día. Las 35 dosificaciones diarias aceptables del agente que es eficaz para elevar las concentraciones de AMPc intracelulares para estimular la producción de AMPc para ayudar a reducir la gravedad de los efectos secundarios inducidos por la administración de un agente antineoplásico pueden ser también de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg/día, y preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 100 mg/día.

40 En los siguientes ejemplos, así como en otras partes de la memoria descriptiva, se usan las siguientes abreviaturas:

AMPc	adenosina monofosfato cíclico
CELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas basado en células
45 CFU-GM	unidad formadora de colonias de granulocitos macrófagos
DMEM	medio de Eagle Modificado por Dulbecco
50 DMSO	dimetil sulfóxido
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
55 FACS	análisis de células activadas con agentes fluorescentes
FBS	suero bovino fetal
60 G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
HBSS	solución salina equilibrada de Hank
65 IMDM	medio de Dulbecco modificado por Iscove

ES 2 267 778 T3

	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PDE4	fosfodiesterasa 4
5	RT	temperatura ambiente
	SRB	sulforrodamina B

Ejemplo 1

10

Preparación de Soluciones Madre de PDE4

Se sintetizaron los inhibidores de PDE4 utilizando procedimientos publicados. Los inhibidores de PDE4 se prepararon como soluciones madre 1,0 mM en DMSO. Los inhibidores de PDE4 preparados fueron Rolipram (Baures, PW, 1993 *J. Med. Chem.* 36 (3274-3277.); Ariflo™ (SB-207499, Christensen S.B. 1998 *J Med Chem* 41, 821-835); GI193600X (Stafford JA *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry* 38(26): 4972-4975, (1995)); RP-73401 (Patente RPR, WO9748697); CDP-840 (Merck, patentes de Celltech WO9723460, WO9723461, WO9738976, WO9742172, WO9812178); nitraquazona y denbufilina (Norman P., 1998, Patentes de Exp. Opin. Ther., 8 (7)), 771 -784); GI198425X (patentes de Syntex, WO-9307146, WO-9319068); y GI147404X (Pfizer Inc., documentos WO-9640636, WO-9705105). En los siguientes ejemplos se utilizaron soluciones madre de PDE4.

Se demostró la prevención de la mielosupresión por la protección de progenitores de neutrófilos por inhibidores de PDE4 de los efectos citotóxicos de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. En los Ejemplos 2-7 se ensayó una diversidad de inhibidores de PDE4 químicamente distintos para comprobar su capacidad de proteger los progenitores de neutrófilos. Se utilizaron tres métodos, descritos con más detalle en los siguientes ejemplos, para una determinación de la supervivencia celular y la capacidad de producir células hijas de progenitores de neutrófilos humanos primarios: (1) un ensayo FACS que determinó el porcentaje de células vivas por el tamaño y la granulación; (2) un ensayo de formación de colonias que midió la cantidad de progenitores CFU-GM (un progenitor de neutrófilos de fase temprana específico); y (3) un ELISA basado en células que midió el antígeno CD15, cuyo índice fue proporcional a la cantidad de células del linaje de los neutrófilos. Este ensayo permite la evaluación de los progenitores de neutrófilos (células que pueden dividirse y producir células hijas del linaje de los neutrófilos) en múltiples fases de diferenciación.

Ejemplo 2

Evaluación por citometría de flujo de células CD34⁺ expandidas tratadas con rolipram más forskolina seguido de tratamiento con paclitaxel

Se recogieron muestras de médula ósea humana de donantes humanos supuestamente sanos después de obtener el consentimiento informado a través de un acuerdo con Duke University Medical Center, Durham, North Carolina. Las células mononucleares se aislaron usando un gradiente de Ficoll-Paque 1.077 de acuerdo con el procedimiento publicado (Dornsife, RE *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother*, 35: 322-328, (1991)) y se suspendieron en HBSS con FBS al 2% a una concentración de 5×10^7 células/ml. Las células madre CD34⁺ se aislaron por el "kit de selección de células madre CD34⁺ StemSep™" siguiendo las instrucciones del fabricante (Stem Cell Technologies). Las células se ajustaron a 1×10^6 células/ml en medio de crecimiento completo y se mantuvieron en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. El medio de crecimiento completo fue IMDM suplementado con FBS al 20%, los antibióticos penicilina-estreptomicina al 1%, el ligando Flt-3/Flk-2 de citoquinas humanas recombinantes (Biosource) (50 ng/ml), el factor de células madre (50 ng/ml), interleuquina-3 (40 ng/ml) y G-CSF (10 ng/ml). Las células se mantuvieron a una densidad comprendida entre 0,5 y 3×10^5 células/ml. Las células madre CD34⁺ se expandieron en cultivo en un intervalo medio de 11 a 23 días. Se trataron cinco grupos de células CD34⁺ expandidas con rolipram (1 μM), más forskolina (100 μM), un activador de la adenilato ciclasa, durante 24 horas y se trataron cinco grupos de células CD34⁺ expandidas con DMSO durante 24 horas. Después de 24 horas, se añadió paclitaxel a las 5 series de células que se trataron con DMSO y a los 5 grupos de células que se trataron con rolipram, para dar las concentraciones finales de 0, 30, 100, 300, y 600 nM de paclitaxel respectivamente y se incubaron durante 24 horas más. Después de las 48 horas de tratamiento, se contaron las células, se lavaron y se resuspendieron en PBS con FBS al 2%. Se sedimentó un total de 1×10^6 células y después se fijaron con paraformaldehído al 0,5% en PBS + solución de FBS al 2%. Las células preparadas se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSort. Los resultados se representan en la Figura 2.

Las células madre CD34⁺ expandidas tratadas con rolipram más forskolina antes del tratamiento con paclitaxel, del Ejemplo 2, se analizaron en un citómetro de flujo (FACS) para determinar la supervivencia y las fracciones de células apoptóticas (Fig. 2). El pretratamiento con rolipram más forskolina redujo significativamente la fracción apoptótica en las células tratadas con paclitaxel en comparación con las células pretratadas solamente con DMSO. A la inversa, la fracción de células supervivientes fue muy superior en las células pretratadas con el régimen quimioprotector (Fig. 2). Las fracciones de células supervivientes después del pretratamiento aumentaron de 45% a 86%, de 27% a 81%, de 23% a 63%, y de 18% a 59% a 30 nM, 100 nM, 300 nM y 600 nM de paclitaxel, respectivamente.

Se realizó un análisis de ensayo T (ANOVA de una vía, con la aplicación de una varianza igual o no igual [diferencia en el error típico de la media (sem) < o > 3 veces, respectivamente] para realizar una comparación entre los grupos de tratamiento para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas (MS Excel, SAS JMP). Se determinó

ES 2 267 778 T3

que los datos antes del tratamiento (rolipram más forskolina) eran estadísticamente diferentes de manera significativa de los controles de DMSO ($p = 0,0062$), lo que indica que sobrevivieron más células.

Es importante tener en cuenta que las células madre CD34⁺ expandidas podrían contener, además de los progenitores de neutrófilos, los progenitores de plaquetas, eritrocitos y/o linfocitos (B, T y NK). La protección de las células CD34⁺ expandidas de los efectos citotóxicos del paclitaxel por el pretratamiento con rolipram más forskolina sugiere que los inhibidores de PDE4 pueden proteger potencialmente a los pacientes con cáncer de las múltiples toxicidades hematopoyéticas en linajes sanguíneos (neutropenia, trombocitopenia y anemia).

10 Ejemplo 3

Protección de los progenitores de neutrófilos tempranos específicos (CFU-GM) medida por el ensayo de formación de colonias - rolipram más forskolina seguido de tratamiento con paclitaxel, 5-fluorouracilo o etopósido

15 Se aislaron células CD34⁺ expandidas, preparadas de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2, y se pretrataron con DMSO o rolipram más forskolina como se ha descrito en el Ejemplo 2. Después de 24 horas, se añadieron cantidades variables de paclitaxel, 5-fluorouracilo y etopósido y se incubaron durante 24 horas más. Después de las 48 horas de tratamiento, las células se contaron, se lavaron dos veces con 4 ml de HBSS suplementado con FBS al 2% y se resuspendieron en medio de crecimiento completo. Después, las células se sembraron en un medio de crecimiento semisólido para el crecimiento de CFU-GM siguiendo un método publicado con la excepción de que se incluyó G-CSF (10 ng/ml) en lugar de GM-CSF y eritropoyetina (Dornsife, RE *et al.*, Antimicrob Agents Chemother, 35: 322-328, (1991); Dornsife RE; Averett DR., Antimicrob Agents Chemother, 40(2): 514-519, (1996)). Se contaron las CFU-GM después de 12 a 14 días. Los resultados se representan en la Figura 3.

25 Los pacientes con cáncer están particularmente predispuestos a infecciones bacterianas debido al hecho de que habitualmente están inmunodeprimidos tanto por el cáncer como por los tratamientos antineoplásicos. Los pacientes con recuentos de neutrófilos de 500/ μ l tienen una susceptibilidad sustancialmente aumentada de infección. Los recuentos de neutrófilos incluso menores proporcionan un riesgo ascendente según disminuye el recuento de neutrófilos.

30 Para examinar el potencial de proteger a los progenitores de neutrófilos tempranos específicos (CFU-GM) de los efectos citotóxicos de fármacos antineoplásicos se usó un ensayo de formación de colonias (Fig. 3) después de que se expusieran las células durante 48 horas de tratamientos en el cultivo líquido especificado previamente en el Ejemplo 3. Después de tratarse las células CD34⁺ expandidas con concentraciones variables de 5-fluorouracilo o etopósido, la cantidad de colonias de CFU-GM disminuyó de un modo dependiente de la dosis con un aumento de las cantidades del fármaco (Fig. 3(a) y 3(b)). Por el contrario, las células CD34⁺ expandidas tratadas con paclitaxel no mostraron una buena respuesta a la dosis (Fig. 3(c)). Sin embargo, un pretratamiento de las células CD34⁺ expandidas con rolipram y forskolina aumentó la supervivencia de los progenitores de CFU-GM, ya que se aumentaba la cantidad de colonias resultantes a un nivel estadísticamente significativo (confianza de 95%) en las células pretratadas con el régimen quimioprotector antes de un tratamiento con 5-fluorouracilo ($p = 0,014$), etopósido ($p = 0,046$) o paclitaxel ($p = 0,012$) en comparación con células pretratadas solamente con DMSO (Fig. 3).

Ejemplo 4

45 *Protección de los progenitores de neutrófilos de múltiples fases medida por el método ELISA basado en células con antígeno de neutrófilos CD15 (CELISA) - rolipram más forskolina seguido de tratamiento con paclitaxel, 5-fluorouracilo, etopósido, vinblastina, vinorelbina, metotrexato o topotecán*

50 Se aislaron células madre CD34⁺ expandidas como se ha descrito en el Ejemplo 2 y se cultivaron en medio de crecimiento completo. Las células CD34⁺ expandidas se trataron con DMSO o rolipram más forskolina como se ha descrito previamente. Después de 24 horas, se añadieron cantidades variables de paclitaxel, 5-fluorouracilo, etopósido, vinblastina, vinorelbina, metotrexato o topotecán y se incubaron durante 24 horas más. Después del tratamiento, se contaron las células, se lavaron dos veces con 4 ml de HBSS suplementado con FBS al 2%, y se resuspendieron en medio de crecimiento completo. La expresión del antígeno CD15 se usó como medida de la cantidad de células del linaje de los neutrófilos expandidas a partir de progenitores supervivientes de múltiples fases de diferenciación (versión modificada del ensayo descrito en Warren *et al.*, 1995 Stem Cells 13:167-174).

60 Las células se sembraron en una cantidad establecida en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 μ l por pocillo de medio completo. En algunos experimentos, se añadieron 100 μ l adicionales de medio completo a las placas mantenidas durante puntos de tiempo posteriores antes de su recogida. Las placas se recogieron en diferentes puntos de tiempo centrifugando a 450 G durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT) y las células se lavaron dos veces en HBSS por centrifugación de las placas. Las células se retiraron por suspensión dos veces en HBSS con EDTA 5 mM con 100 μ l por pocillo y transferencia del volumen total de 200 μ l a placas de captura (Costar DNA-bind, N° 2498) que se habían pretratada con glutaraldehído al 1% y se habían almacenado (Warren *et al.*, 1995 Stem Cells 13: 167-174).

65 Para el CELISA, se retiró la solución conservante (PBS, BSA al 0,1%, azida al 0,1%) de la placa de captura y se lavaron los pocillos con 100 μ l de PBS. Se añadió un anticuerpo de ratón anti-CD15 humano (Biosource Clone B-H8 0,5 μ g/pocillo, 100 μ l de PBS con suero de cabra al 5%) y la mezcla se incubó a RT durante 60 minutos. Las

ES 2 267 778 T3

placas se lavaron dos veces con 300 μ l de PBS/pocillo y se incubaron con un anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón-biotina, Sigma B-9265, 0,105 μ g/pocillo, 100 μ l de PBS con suero de cabra al 5%) a RT durante 60 minutos. Después de tres a seis lavados con 200 μ l/pocillo, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Pierce 21126, 0,1 μ g/pocillo en una solución al 1% de tampón de peróxido estable, Pierce 34062). Las placas se incubaron durante 10 minutos y se lavaron de tres a seis veces con 200 μ l/pocillo. Para la etapa de detección final, se añadió a las placas (100 μ l por pocillo) el reactivo quimioluminiscente Supersignal™ Ultra (Pierce 34075) preparado justo antes de su uso mezclando partes iguales de luminol-potenciador y peróxido estable, y se mezclaron suavemente durante cinco minutos a RT. Las placas se leyeron en una máquina Wallace Victor II durante un segundo para determinar la quimioluminiscencia a 425 nm.

Los datos del Wallac Victor se transfirieron a Excel para su análisis. Se calcularon los promedios de pocillos duplicados de células tratadas junto con el error típico de la media (sem) de los recuentos menos la señal de fondo de los pocillos duplicados sólo con medio (sin células). Los resultados se representan en la Figura 4.

La protección de los progenitores de neutrófilos de los efectos citotóxicos de agentes antineoplásicos por pretratamiento con rolipram en combinación con forskolina se confirmó adicionalmente en el Ejemplo 4 por un método CELISA (Fig. 4). La expresión de CD15, un antígeno expresado en progenitores CFU-GM con especificidad de fase así como otras células del linaje granulocítico (neutrófilos), por CELISA se usó para confirmar la protección estadísticamente significativa de múltiples fases de progenitores de neutrófilos. Este ensayo mide la recuperación y expansión de células CD15+ a partir de progenitores de neutrófilos (los que son capaces de dividirse y producir células hijas CD15+). La señal CD15 procedente de los cultivos celulares disminuyó al aumentar las concentraciones de paclitaxel, 5-fluorouracilo, etopósido, vinblastina, vinorelbina, metotrexato o topotecán (Fig. 4A-4G). Un pretratamiento de las células CD34+ expandidas con rolipram más forskolina aumentó la señal antigénica CD15 a un nivel estadísticamente significativo (confianza de 99%) (paclitaxel $p = 1,3 \times 10^{-11}$, 5-FU $p = 4,8 \times 10^{-7}$, etopósido $p = 5,8 \times 10^{-6}$, vinblastina $p = 4,4 \times 10^{-3}$, vinorelbina $p = 1,5 \times 10^{-9}$, metotrexato $p = 1,2 \times 10^{-7}$ y topotecán $p = 9,8 \times 10^{-8}$), lo que indica que sobrevivieron más progenitores a los efectos citotóxicos de los agentes antineoplásicos para dividirse y producir más células hijas CD15+ que en el caso de los progenitores pretratados solamente con DMSO (Fig. 4).

Ejemplo 5

Protección de progenitores de neutrófilos de múltiples fases medida por el método CELISA basado en antígeno CD15 de neutrófilos - inhibidores de PDE4 (distintos de rolipram) más forskolina seguido de tratamiento con paclitaxel

Se protegieron los progenitores de neutrófilos por inhibidores de PDE4 (a) Ariflo™, o (b) Piclamilast, (c) CDP-840 [GR259653X], (d) CDP-840 [GR259654X], (e) Nitraqazona, (f) Denbufilina, (g) RS-25344, (h) CP-77059 e (i) GI193600X cada uno en combinación con forskolina, de los efectos citotóxicos del paclitaxel, medido por medio de un CELISA. Los detalles experimentales de este experimento son iguales a los descritos en el Ejemplo 4, con la excepción de que el rolipram se sustituyó por otro inhibidor de PDE4 (1 μ M). Los resultados se representan en la Figura 5.

El Ejemplo 5 ilustra la protección de los progenitores de neutrófilos de los efectos citotóxicos del paclitaxel por una diversidad de inhibidores específicos de PDE4 cada uno en combinación con forskolina, medido por el método CELISA. El pretratamiento de células CD34+ expandidas con cada uno de los diferentes inhibidores de PDE4 más forskolina aumentó la expresión de la señal CD15+ a un nivel estadísticamente significativo (Ariflo™ $p = 2,7 \times 10^{-9}$, Piclamilast $p = 8,5 \times 10^{-15}$, CDP-840 [GR259653X] $p = 1,9 \times 10^{-5}$, CDP-840 [GR259654X] $p = 6,5 \times 10^{-13}$, Nitraqazona $p = 1,0 \times 10^{-8}$, Denbufilina $p = 1,1 \times 10^{-9}$, RS-25344 $p = 2,2 \times 10^{-6}$, CP-77059 $p = 3,2 \times 10^{-7}$ y GI193600X $p = 3,4 \times 10^{-13}$), lo que sugiere que sobrevivieron más progenitores de neutrófilos a los efectos citotóxicos del agente antineoplásico paclitaxel (Fig. 5(a)-Fig. 5(i)).

Ejemplo 6

Protección de progenitores de neutrófilos medida por el método CELISA con antígeno CD15 de neutrófilos - Ariflo™ más forskolina seguido de tratamiento con topotecán

Se protegieron progenitores de neutrófilos por Ariflo™ más forskolina de los efectos citotóxicos de topotecán, y el resultado se midió por CELISA. Los detalles experimentales de este experimento son iguales a los descritos en el Ejemplo 4 con la excepción de que el rolipram se sustituyó por Ariflo™ (1 μ M) y se usó topotecán como agente antineoplásico. Los resultados se representan en la Figura 6.

El Ejemplo 6 ilustra la protección de progenitores de neutrófilos de los efectos citotóxicos del topotecán por Ariflo™ más forskolina medido por el método CELISA. El pretratamiento de células CD34+ expandidas con Ariflo™ más forskolina aumentó la expresión de la señal CD15+ a un nivel estadísticamente significativo ($p = 1,5 \times 10^{-5}$), lo que sugiere que sobrevivieron más progenitores de neutrófilos a los efectos citotóxicos del agente antineoplásico topotecán (Fig. 6).

ES 2 267 778 T3

Ejemplo 7

Protección de progenitores de neutrófilos medida por el método CELISA con antígeno CD 15 de neutrófilos - rolipram más forskolina seguido de tratamiento con los agentes antineoplásicos indicados en la Tabla 1

Se midió la protección de progenitores de neutrófilos de los efectos citotóxicos de diferentes agentes antineoplásicos, indicados en la Tabla 1, por el inhibidor de PDE4 rolipram usado en combinación con forskolina por el método CELISA de acuerdo con el Ejemplo 4. Los resultados se representan en la Tabla 1.

TABLA 1

Fármaco	Protección?	Diana/mecanismo	Ciclo celular
Paclitaxel	SÍ	Microtúbulos, estabilizador	G2/M
Vinblastina	SÍ	tubulina, desestabilizador	G2/M
Vinorelbina	SÍ	bloquea la polimerización de los túbulos	M
Etopósido	SÍ	estabiliza la enzima topoisomerasa II	G2/M
5-FU	SÍ	anti-metabolito, inhibidor de ADN sintetasa	S
metotrexato	SÍ	inhibidor de la síntesis de purinas	S, G2
topotecán	SÍ	inhibidor de la topoisomerasa I	G2/M, S
Cisplatino	NO	se une a ADN, X-link	no específico
Carboplatino	NO	se une a ADN, lesiones diferentes al cisplatino: no específico	
Doxorrubicina	NO	se intercala en el ADN, estabiliza la enzima topo II: no específico	

Se midió la protección de progenitores de neutrófilos de los efectos citotóxicos de diferentes agentes antineoplásicos por el inhibidor de PDE4 rolipram en combinación con forskolina por el método CELISA. Los resultados se resumen en la Tabla 1. El rolipram y la forskolina protegieron a los progenitores de neutrófilos de los agentes que actúan de un modo específico del ciclo celular. Por el contrario, no se observó protección de los agentes que se une al ADN y actúan de un modo no específico del ciclo celular. Por ejemplo, la Figura 7 representa los resultados para agentes neoplásicos sin especificidad celular cisplatino, doxorubicina y carboplatino con pretratamiento con rolipram más forskolina. Para los efectos del carboplatino, el pretratamiento de rolipram más forskolina de las células en comparación con DMSO no mostró una diferencia significativa ($p = 0,55$). Para el cisplatino ($p = 0,027$) y la doxorubicina ($p = 0,0032$), sin embargo, el pretratamiento con rolipram más forskolina no sólo no protegió, sino que parecía aumentar significativamente la toxicidad hacia los progenitores de neutrófilos.

La protección potencial de la mucositis inducida por agentes antineoplásicos por medio del pretratamiento con inhibidores de PDE4 se ilustra en el Ejemplo 8. Después de la agresión tóxica por un agente antineoplásico, la lesión tisular inicial y la inflamación provocan la muerte de células epiteliales en proliferación. En las fases tardías de la mucositis intervienen la atrofia tisular y la formación de úlceras. Se usó un modelo *in vitro* usando células del epitelio pulmonar de visón para examinar si un régimen quimioprotector que incluía un inhibidor de PDE4 sería útil para prevenir la mucositis. Se cree que un inhibidor de PDE4 podría prevenir potencialmente la mucositis de dos formas: 1) protegiendo a las células progenitoras epiteliales y 2) produciendo un efecto contra el factor de necrosis tumoral (anti-inflamatorio).

Ejemplo 8

Protección de células de epitelio pulmonar de visón por diferentes inhibidores de PDE4 en combinación con forskolina de los efectos citotóxicos del paclitaxel (10 nM)

Se cultivaron crecer células de epitelio pulmonar de visón CCL64 (ATCC N° CCL-64) en DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomycinina al 1% y se sembraron en placas de 96-pocillos. Después de una incubación durante una noche a 37°C, las células se trataron con forskolina 100 μ M en combinación con cada uno de los inhibidores de PDE4 (1 μ M). Después de 24 horas de tratamiento, se añadió paclitaxel a los pocillos a diversas concentraciones hasta 10 nM. Se recogieron las placas de control a tiempo cero por tinción con Sulforrodamina B (Skehan P. *et al.*, (1990), J. Nat'l Cancer Inst 82:1107-12.) Después de 48 horas más de incubación a 37°C, se recogieron las placas y se tiñeron con sulforrodamina B. Se leyó la absorbancia de las muestras a una densidad óptica de 562 nm. Los controles sin fármaco se ajustaron a 100% y los valores se normalizaron con respecto al control a tiempo cero. Los resultados se representan en la Tabla II.

ES 2 267 778 T3

TABLA II

Inhibidor de PDE4	% de Aumento en la Supervivencia
Rolipram	110
Ariflo™	110
GI193600X	120
Picamilast	130
CDP-840 ¹	125
Nitraquazona	115
CDP-840 ²	110
RS25344	105
Denbufilina	95
CP-77059	85
¹ GR259653X ² GR259654X	

Como se ha indicado en el Ejemplo 8, las células se pretrataron con forskolina más diversos inhibidores de PDE4 (1 μ M) y después se expusieron a paclitaxel a diversas concentraciones.

La señal de sulforrodamina B de las células se expresó como un porcentaje de control (sin fármaco, sólo vehículo). El aumento en la señal, que indica protección, varió de 85% a 130% con las células pretratadas con forskolina más un inhibidor de PDE4 particular y seguido de la exposición a paclitaxel a 10 nM.

Es extremadamente importante que un agente que proteja a las células normales frente a la toxicidad inducida por agentes antineoplásicos no afecte a los efectos antitumorales del agente. En el Ejemplo, se ensayaron líneas celulares humanas que representan tipos tumorales de colon, pulmón y mama con el régimen de quimioprotección de rolipram más forskolina o Ariflo™ más forskolina para examinar si protegerían o no de los efectos antineoplásicos del fármaco contra el cáncer paclitaxel.

Ejemplo 9

Ningún efecto sobre la actividad antitumoral con las líneas celulares de tumor humano HT-29 (colon), RKO (colon), A549 (pulmón) y MDA468 (mama) tratadas con forskolina más rolipram o forskolina más Ariflo™ seguido de tratamiento con paclitaxel

Se obtuvieron las líneas celulares de tumor humano HT-29 (colon: ATCC N° HTB 38), RKO (colon, ATCC N° HTB 130), A549 (pulmón, ATCC N° CCL 185) y MDA468 (mama, ATCC N° HTB 132) de la American Type Culture Collection y se mantuvieron en DMEM que contenía FBS al 10%. Se cultivaron células tumorales a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las células tumorales adherentes se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 6 horas para permitir su unión. Después de 6 horas, se añadieron los quimioprotectores forskolina (100 μ M) más rolipram (1 μ M) o forskolina (100 μ M) más Ariflo™ (1 μ M). Después de una noche de incubación, se añadió paclitaxel (100 nM) durante 24 horas. Después, las células se lavaron para retirar los quimioprotectores y el paclitaxel, se pusieron en medio fresco y se dejaron crecer durante 5 días. Se midió el crecimiento diariamente usando sulforrodamina B (Skehan P. et. al., (1990), J. Nat'l Cancer Inst 82:1107-12). Los resultados se representan en la Figura 8.

En las Figuras 8 (a), (b), (c) y (d), se ensayaron dos líneas de cáncer de colon diferentes (RKO, HT-29) con rolipram o Ariflo™ como inhibidor de PDE4 en el régimen de quimioprotección (forskolina más inhibidor de PDE4). Después, las células se expusieron a paclitaxel 100 nM. Cuando se expusieron a paclitaxel, no hubo efectos sobre la inhibición del crecimiento de células tumorales entre células que recibieron el régimen quimioprotector frente a las que se pretrataron con DMSO. Las células tumorales de control que no se expusieron a paclitaxel se expandieron rápidamente en 72 horas.

ES 2 267 778 T3

En las Figuras 8 (e), (f), (g) y (h) se observaron resultados similares con una línea celular de cáncer de mama (MDA468, de la que se controló el crecimiento un día sí y otro no durante 10 días) y la línea celular de cáncer de pulmón (A549). Aunque la línea celular de pulmón A549 no se inhibía completamente por paclitaxel, esta línea celular tampoco tuvo ninguna protección adicional con el régimen quimioprotector de forskolina más rolipram o forskolina más Ariflo™. Estos datos demuestran claramente que el régimen quimioprotector de inhibidor de PDE4 y forskolina no protege a las células tumorales de los efectos antineoplásicos del paclitaxel.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de tratamiento contra el cáncer, que comprende: cantidades terapéuticamente eficaces de:

5 (i) un agente antineoplásico que afecta de manera adversa a las células progenitoras normales después del uso, seleccionado entre paclitaxel, docetaxel, topotecán, irinotecán, 7-(4-metilpiperazino-metileno)-10,11-etilenodioxi-20-camptotecina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, etopósido, tenipósido, fluorouracilo, metotrexato, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, 5-azacitidina, gemcitabina, pentostatina, eritrohidroxinoniladenina, fludarabina fosfato y cladribina;

10 (ii) un inhibidor de PDE4 seleccionado entre ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo, N-(3,5-dicloropirid-4-il)-3-ciclopentiloxi-4-metoxibenzamida, (E)-O-{aminocarbo-
15 nil}oxima de 1-[(3-ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]etanona, (+/-)-4-[2-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-feniletil]piridina, nitroquazona, rolipram, denbufilina, 8-aza-1-(3-nitrofenil)-3-(4-piridilmetil-2,4-quinazolinadiona), 1-(3-carbo-
metoxifenil)-3-bencilpirido[2,3d]pirimidina-2,4(1H,3H)diona y (3S,4S)-3-acetil-[3-(ciclopentiloxi)-4-metiloxi]fenil]-
3-metil-pirrolidinacarboxilato de metilo; y

20 (iii) un agente eficaz para aumentar las concentraciones intracelulares de AMPc o análogos del mismo seleccionados entre forskolina, dibutilil AMPc, 8-bromo AMPc, terbutalina, albuterol, pirbuterol, bitolterol, metaproterenol, formoterol y salmeterol o una sal de los mismos.

2. La combinación de la reivindicación 1, en la que el inhibidor de PDE4 es ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico o una sal del mismo.

3. La combinación de la reivindicación 1, en la que el agente eficaz para elevar las concentraciones intracelulares de AMPc o análogos del mismo se selecciona entre forskolina y salmeterol o una sal de los mismos.

4. La combinación de la reivindicación 3, en la que el agente eficaz para elevar las concentraciones intracelulares de AMPc o análogos del mismo es forskolina.

5. La combinación de la reivindicación 1, en la que el agente antineoplásico que afecta de manera adversa a las células progenitoras normales después de su uso se selecciona entre paclitaxel y topotecán.

6. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

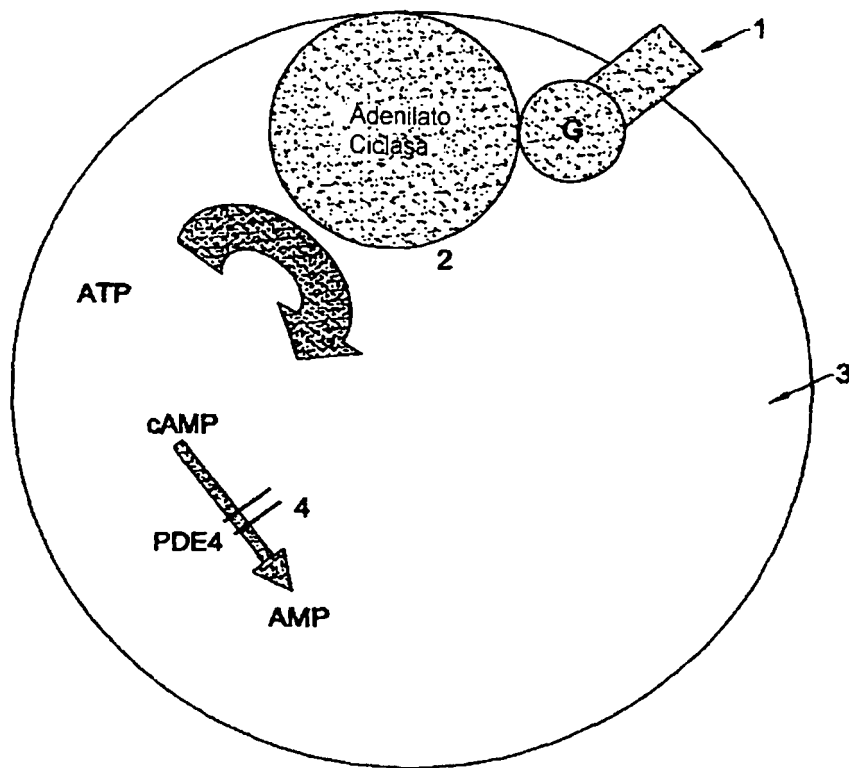


FIG. 1.

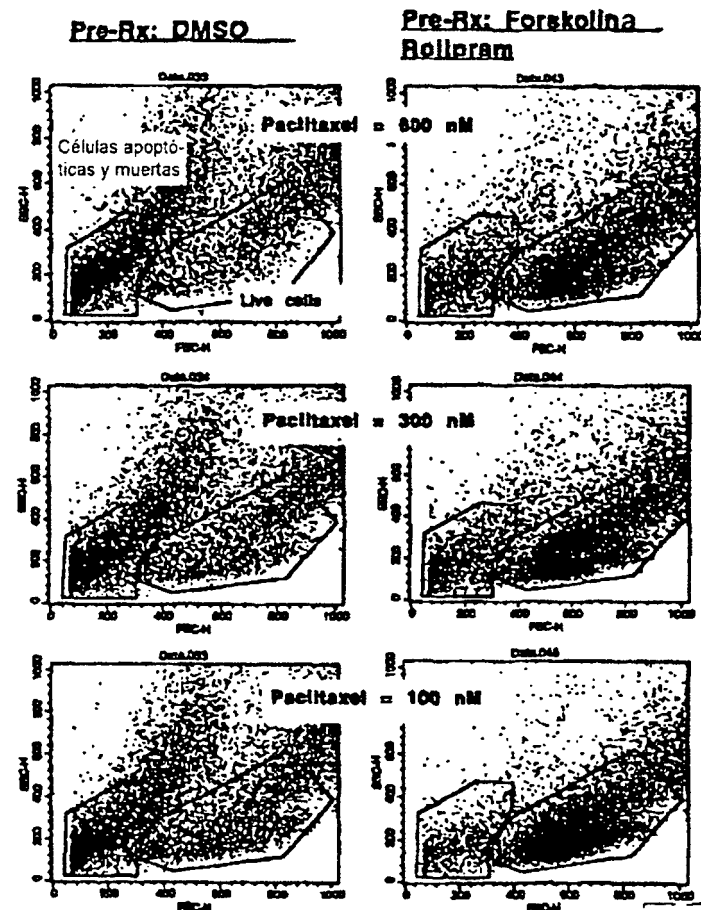


FIG. 2(a).

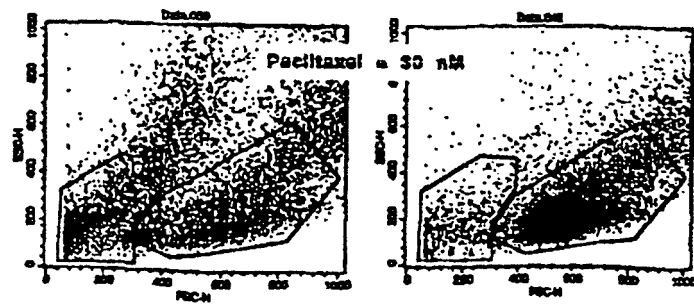


FIG. 2(b).

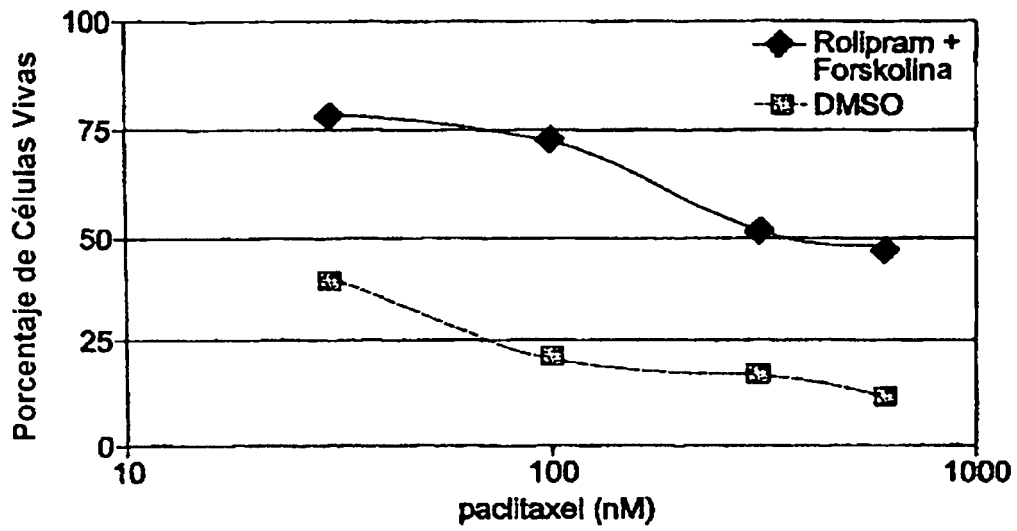
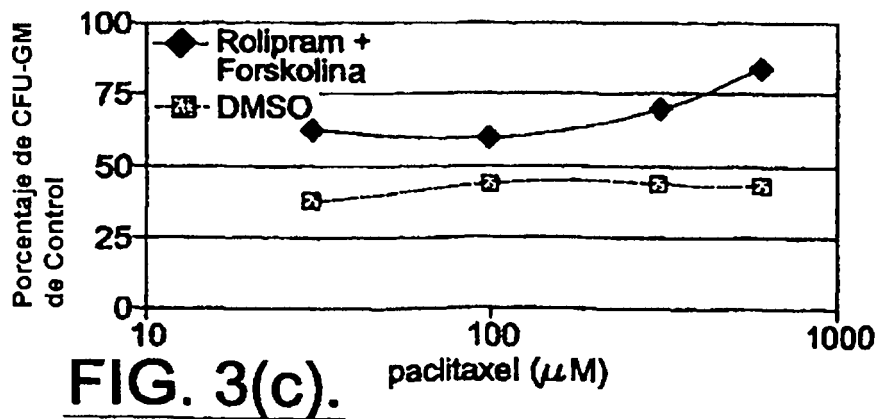
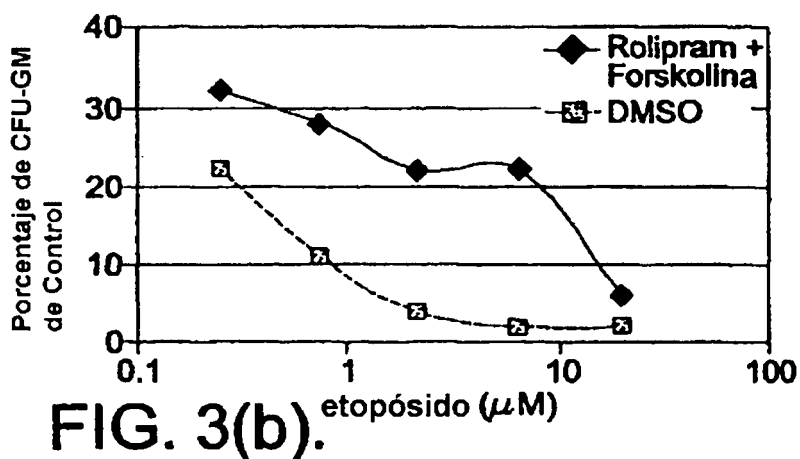
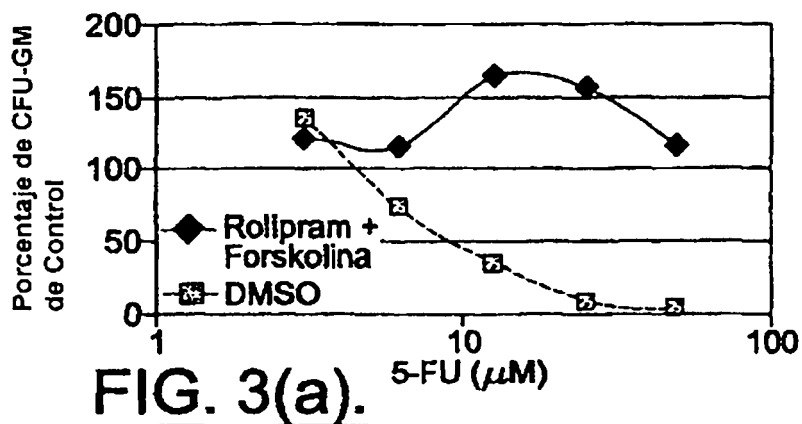


FIG. 2(c).



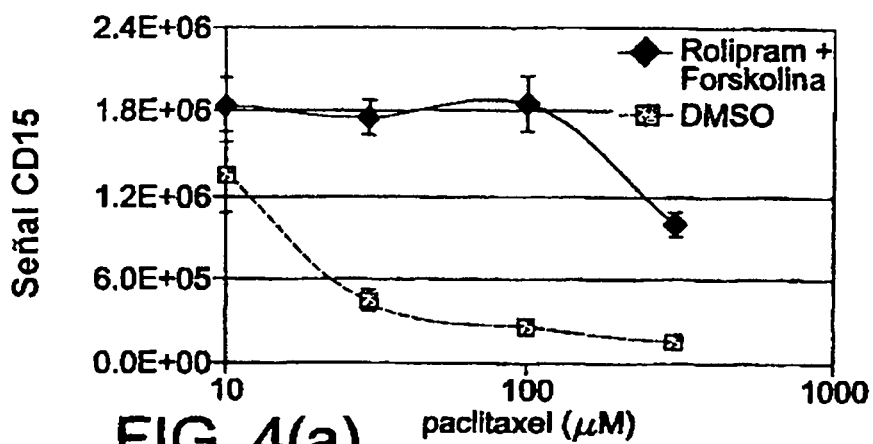


FIG. 4(a).

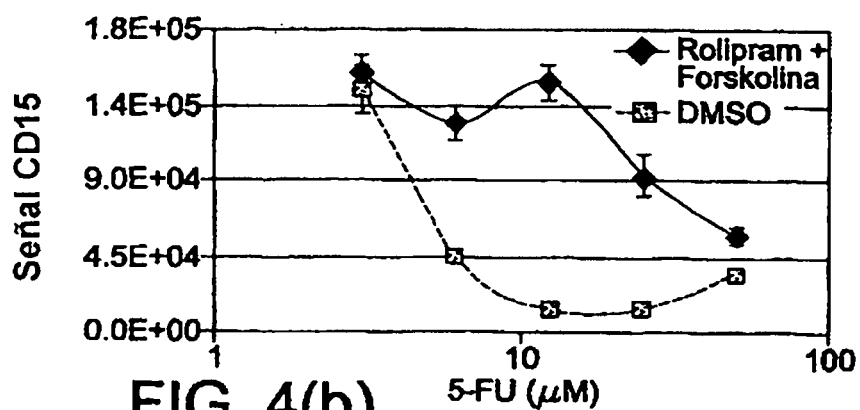


FIG. 4(b).

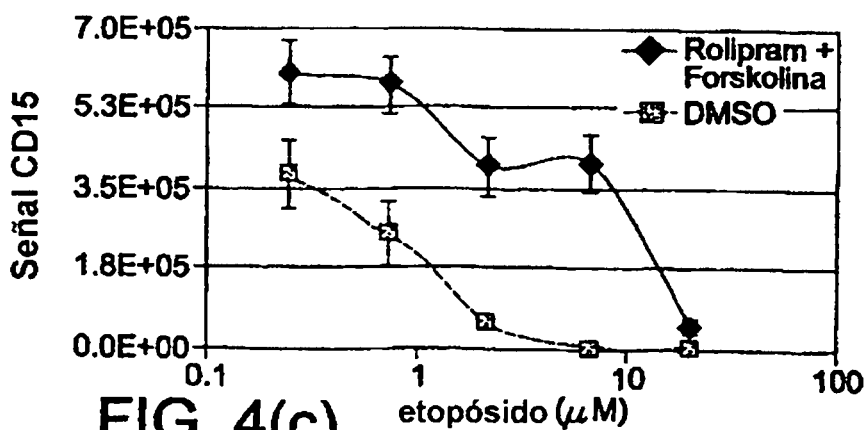
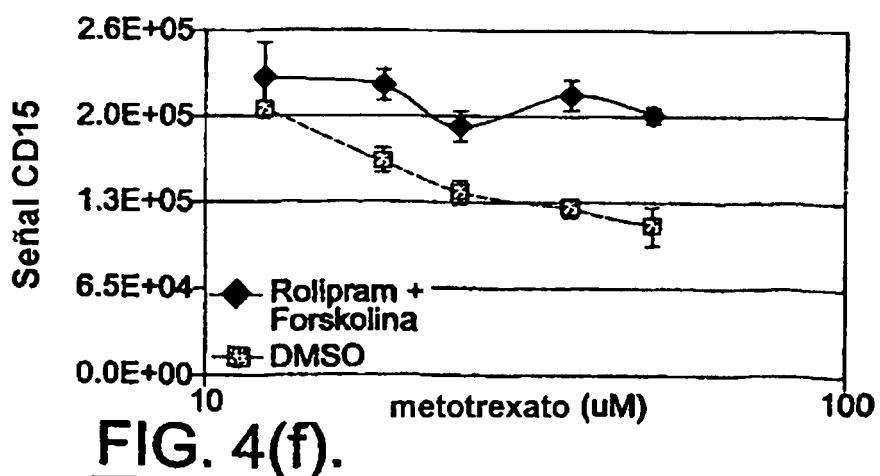
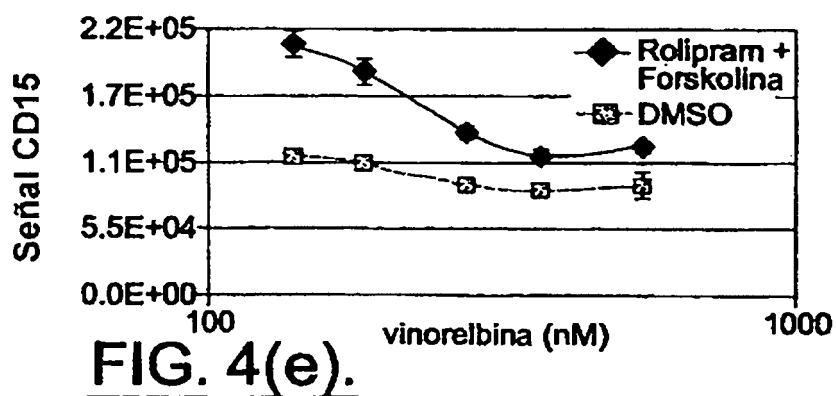
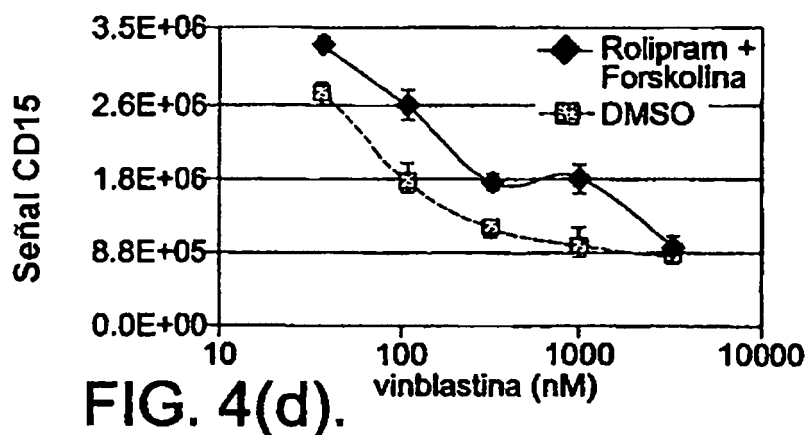
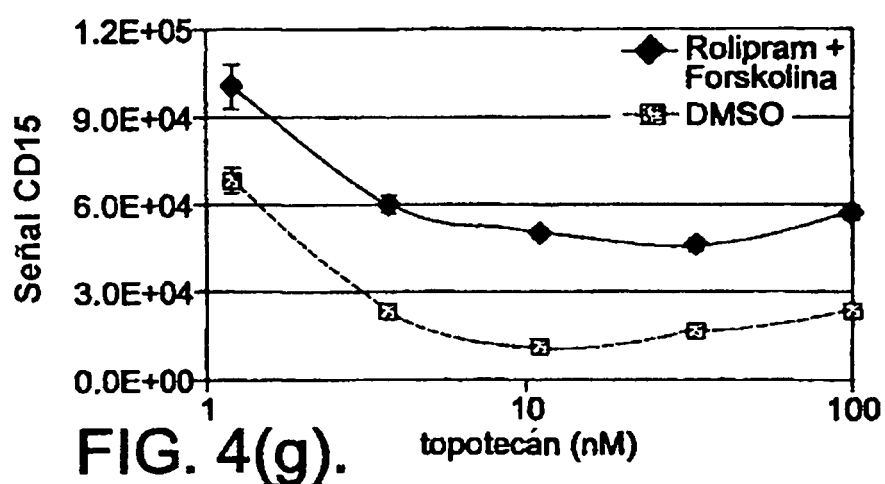


FIG. 4(c).





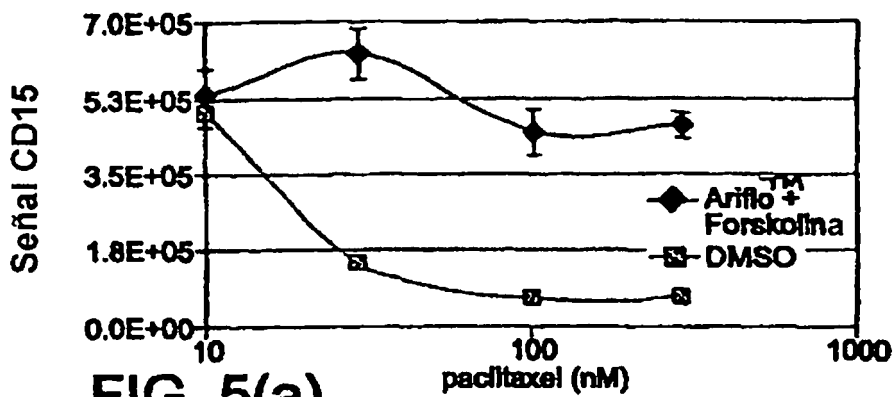


FIG. 5(a).

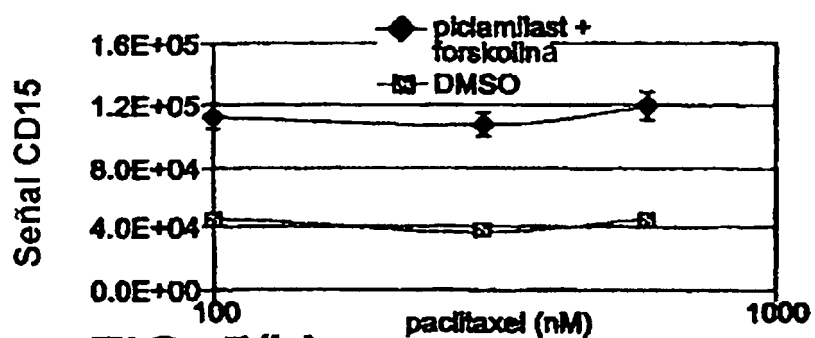


FIG. 5(b).

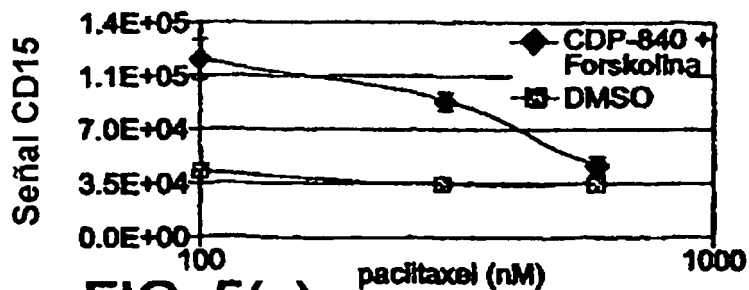


FIG. 5(c).

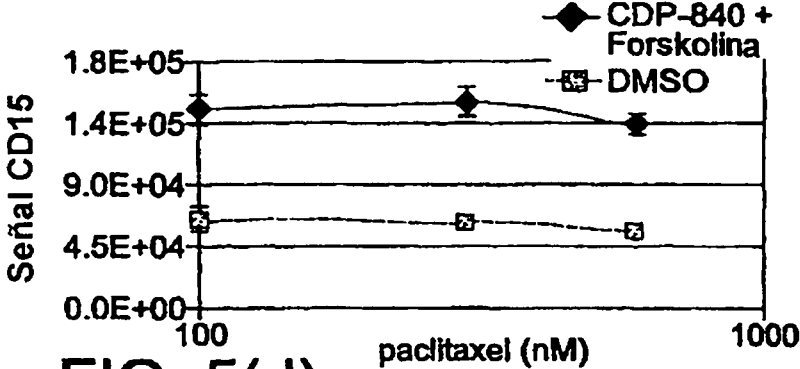


FIG. 5(d).

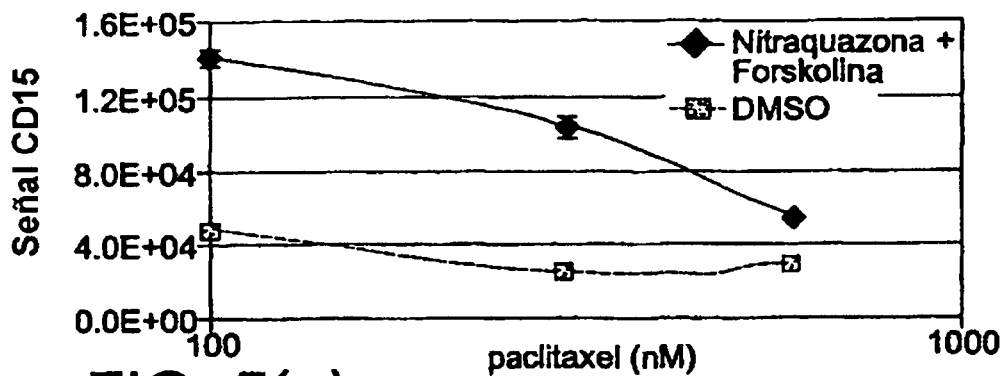


FIG. 5(e).

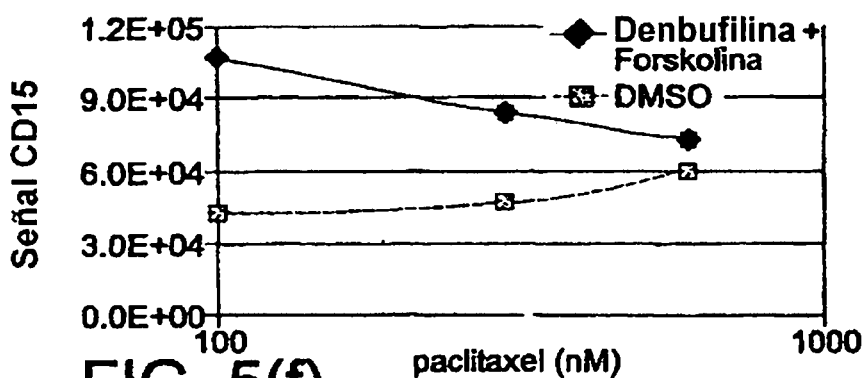


FIG. 5(f).

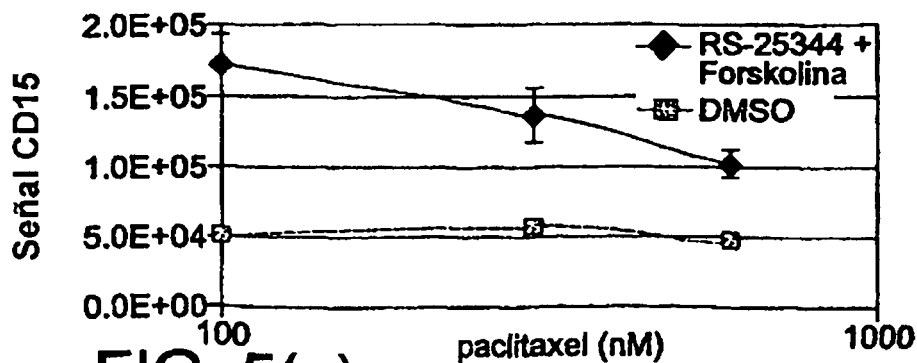


FIG. 5(g).

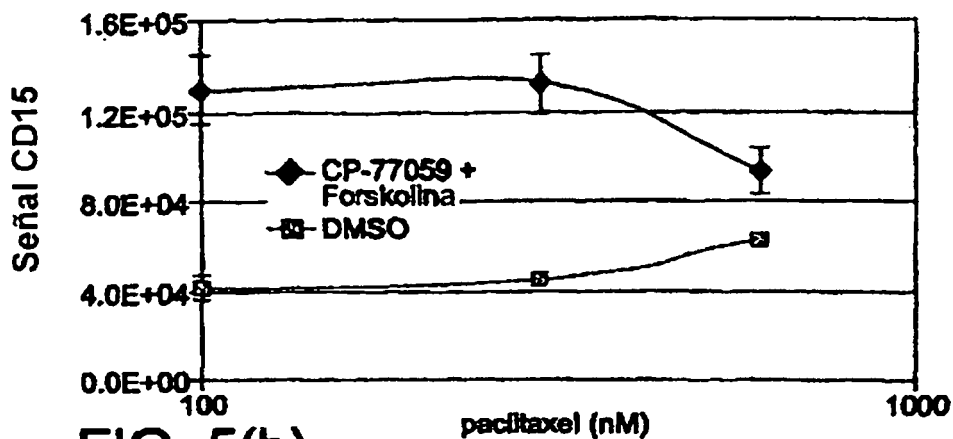


FIG. 5(h).

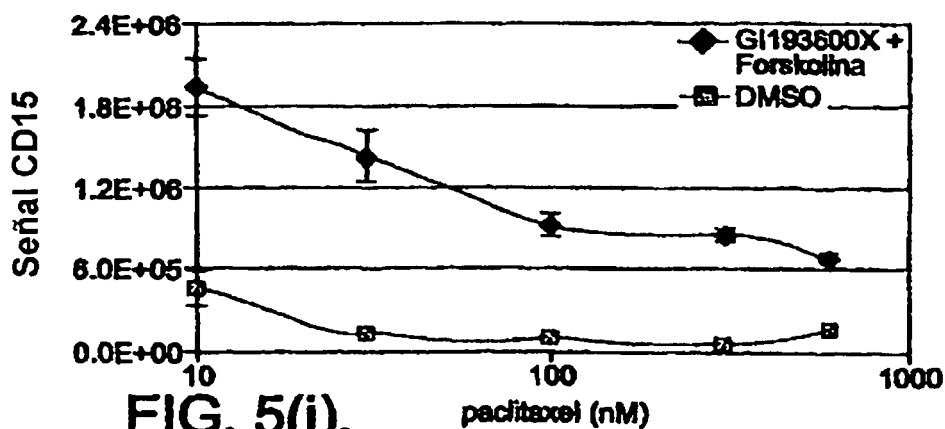


FIG. 5(i).

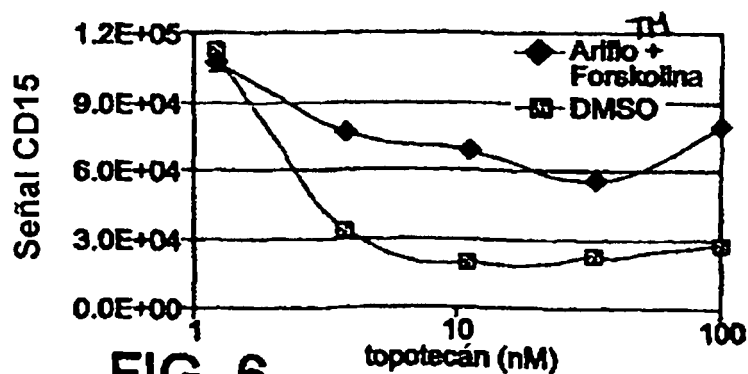


FIG. 6.

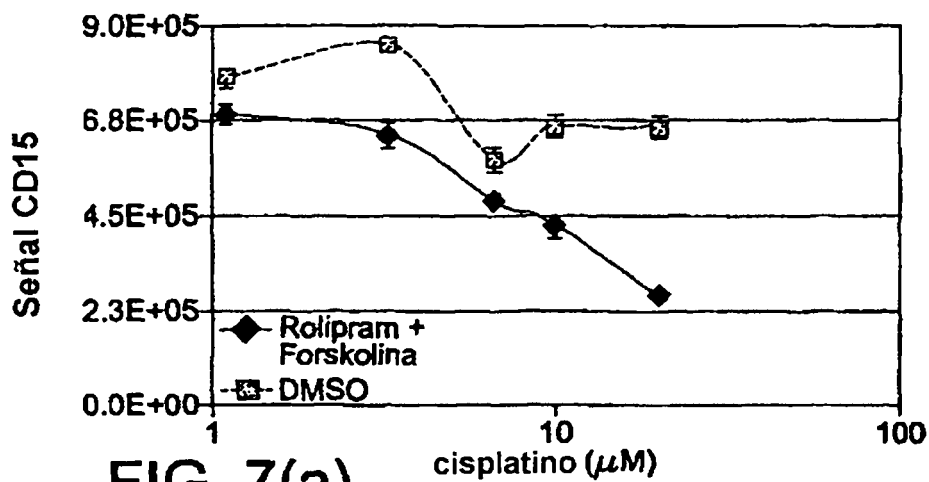


FIG. 7(a).

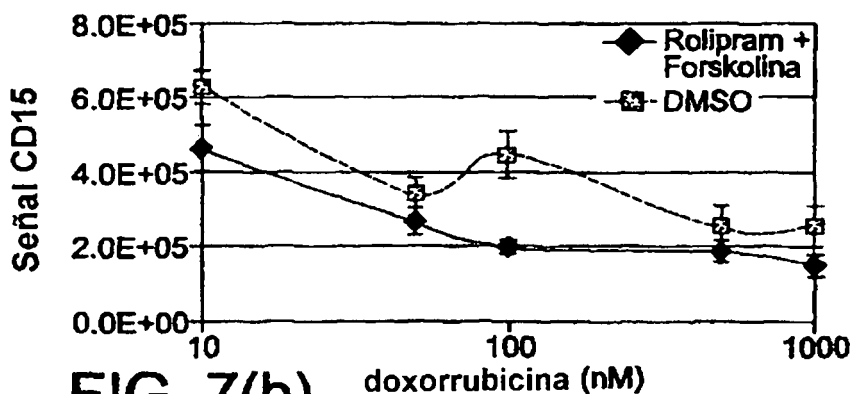


FIG. 7(b).

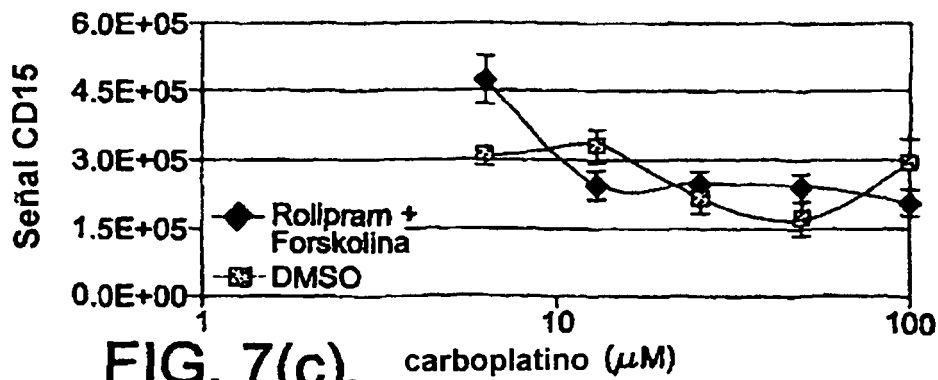
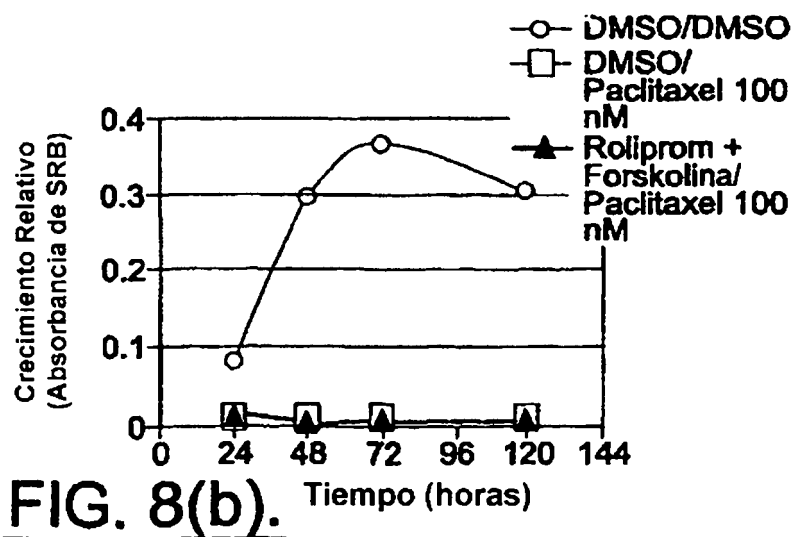
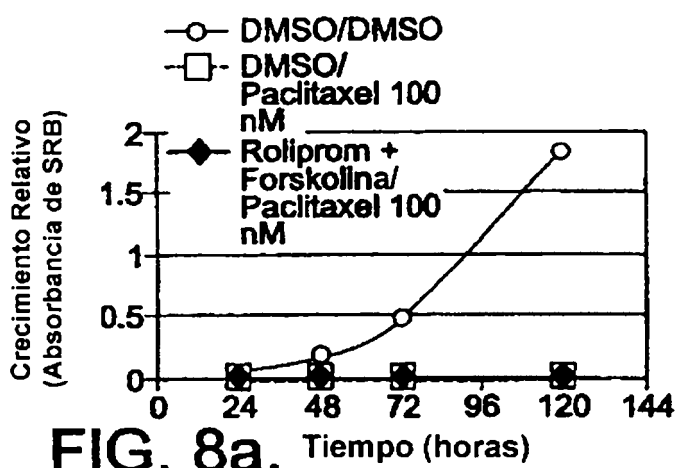


FIG. 7(c).



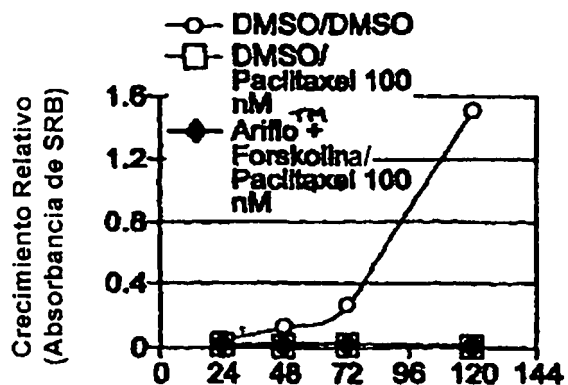


FIG. 8(c). Tiempo (horas)

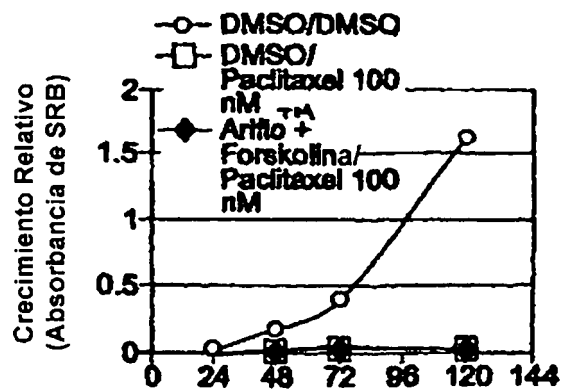


FIG. 8(d). Tiempo (horas)

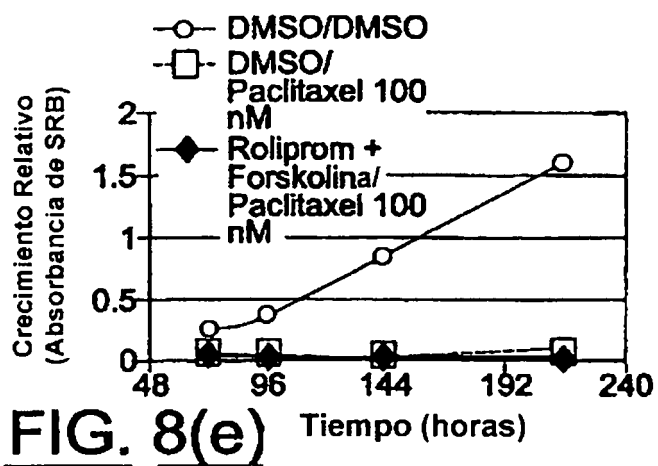


FIG. 8(e)

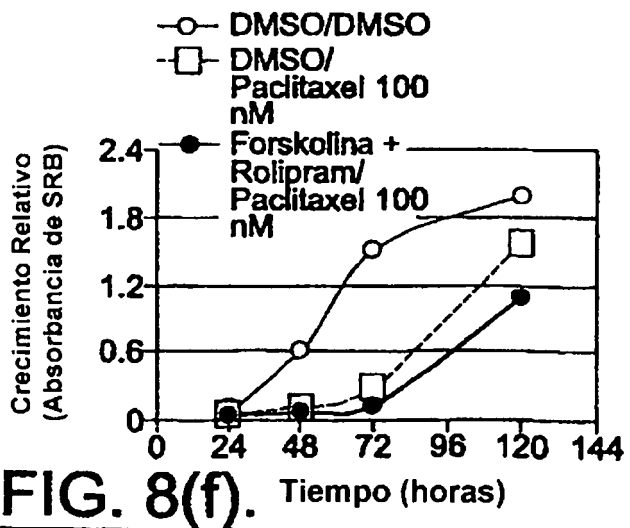
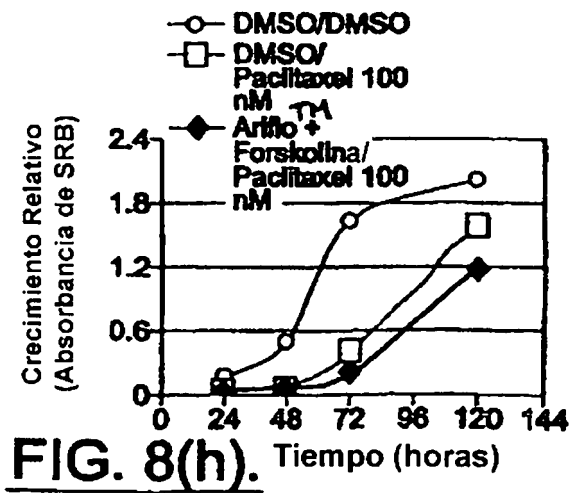
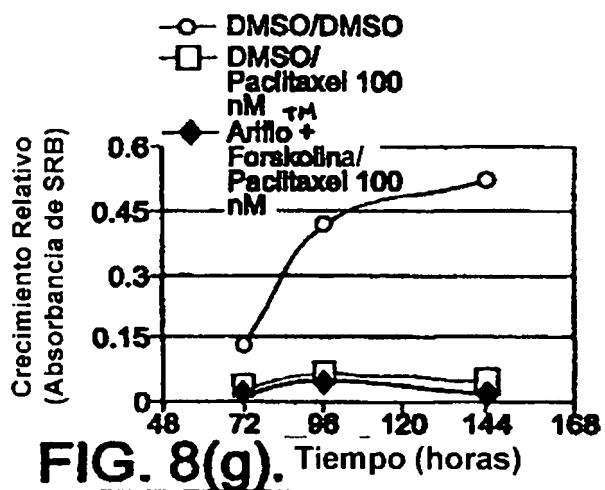
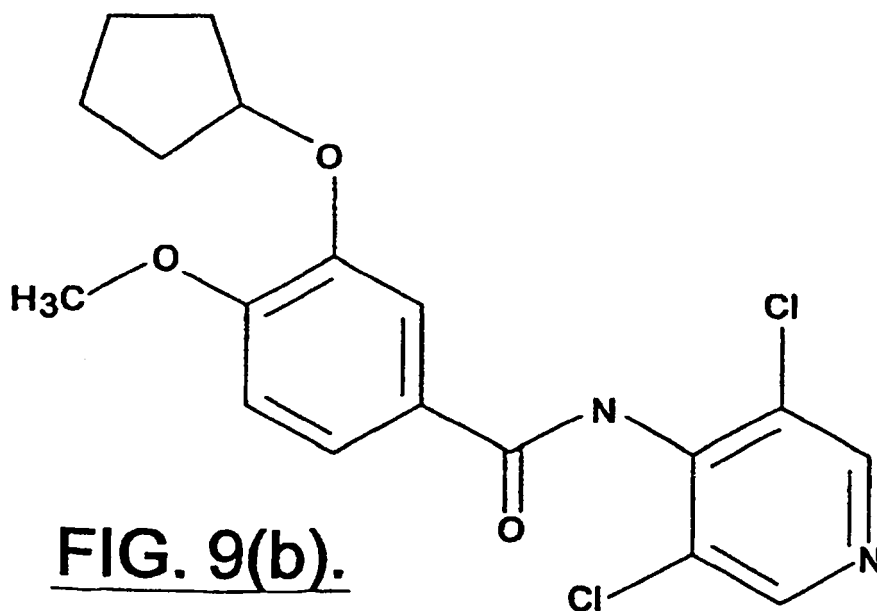
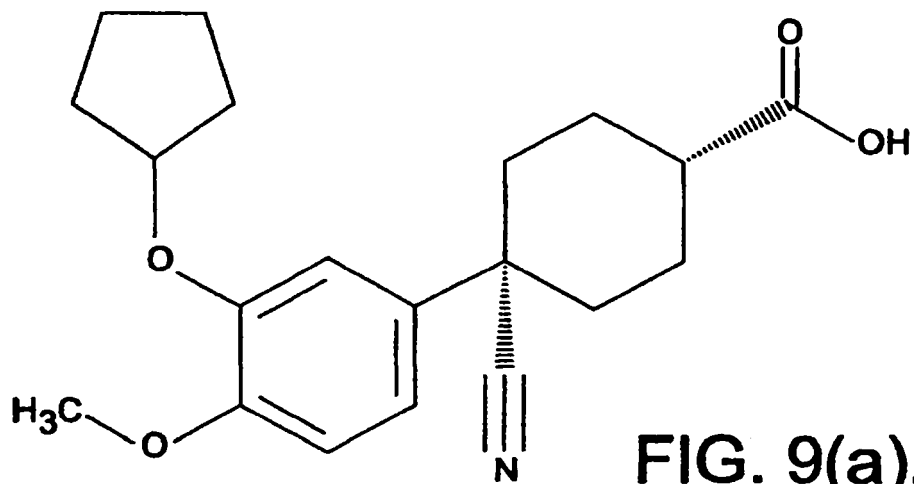
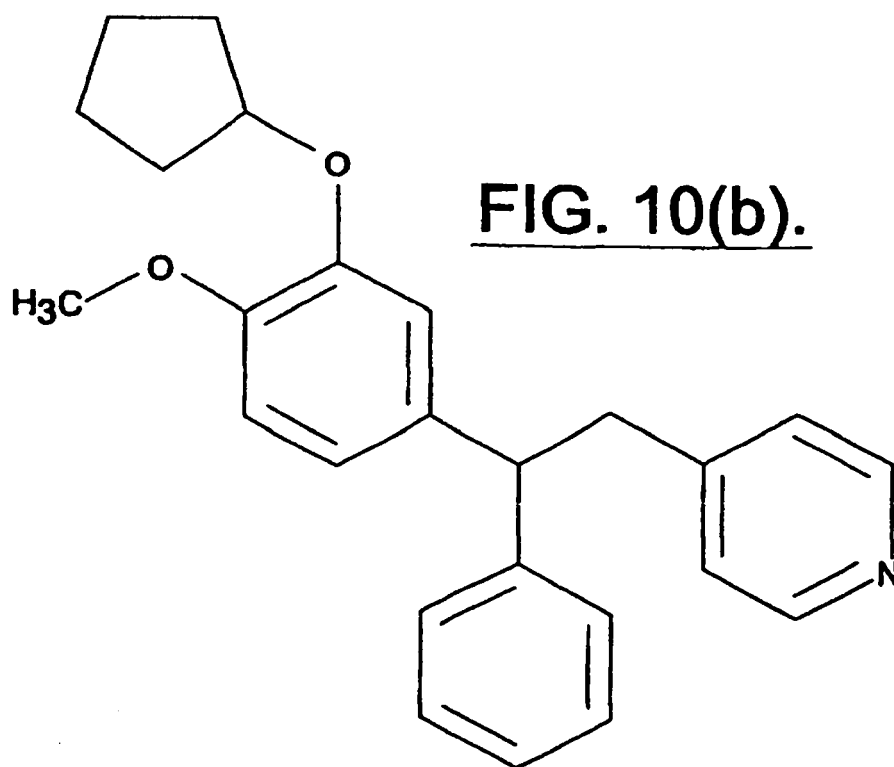
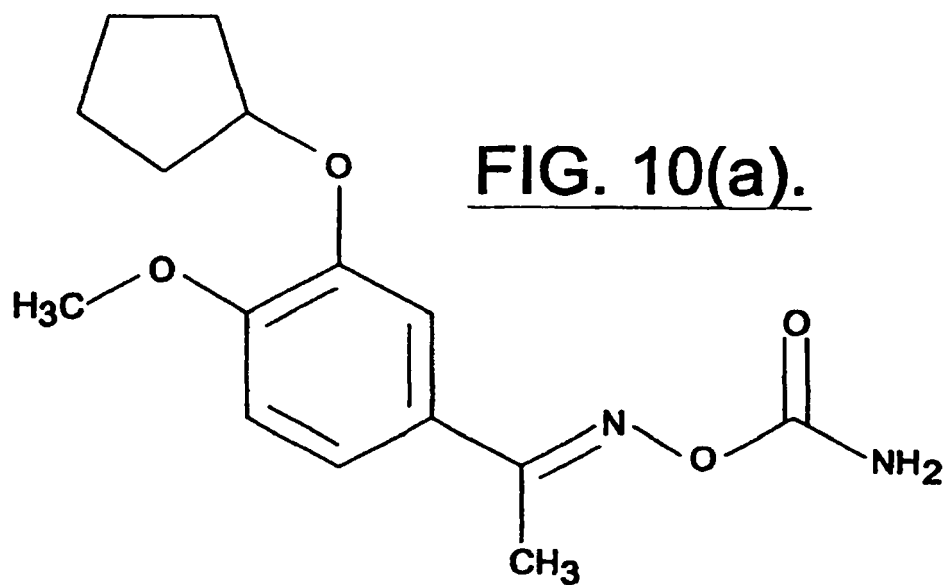


FIG. 8(f)







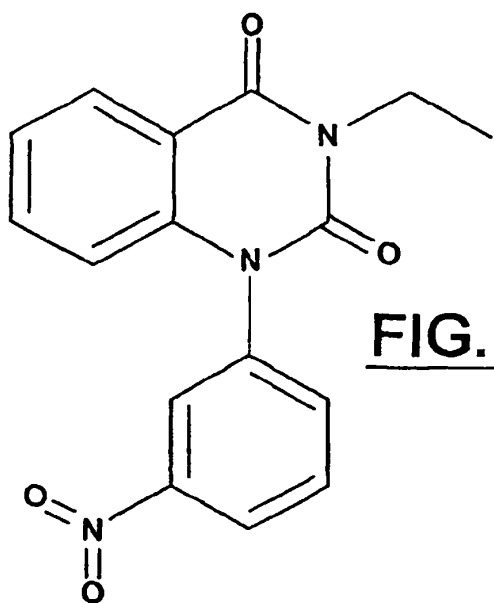


FIG. 11(a).

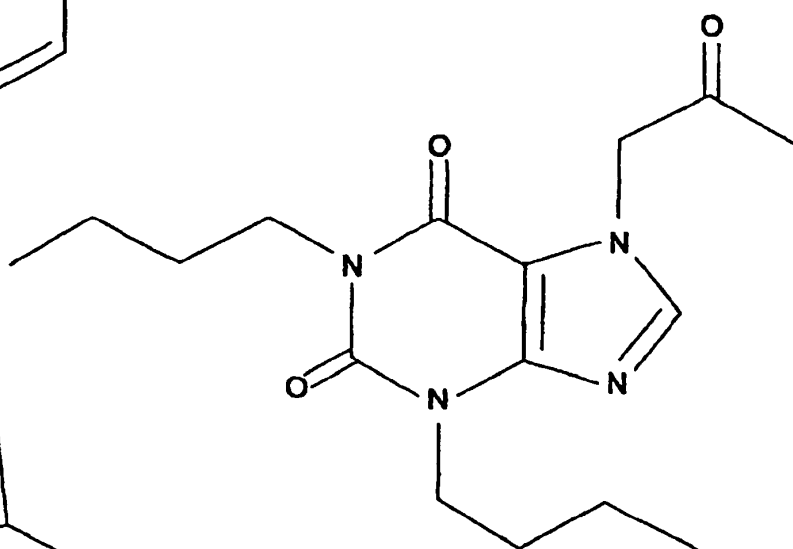


FIG. 11(b).

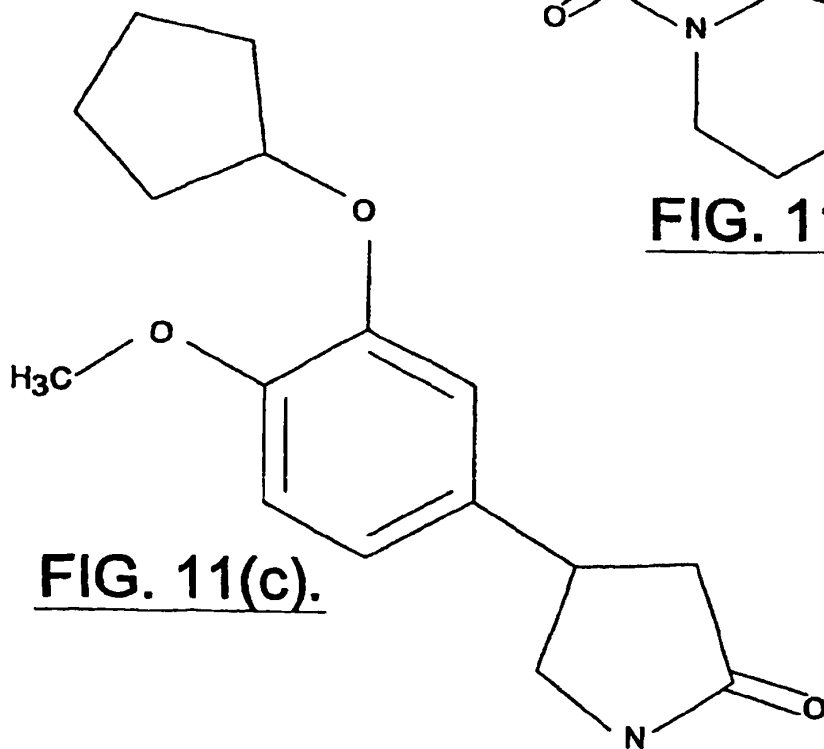


FIG. 11(c).

