



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 202**

51 Int. Cl.:
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03810527 .6**
96 Fecha de presentación : **05.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1558242**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Combinación que comprende docetaxel y un inhibidor de CDK.**

30 Prioridad: **06.11.2002 GB 0225872**
11.08.2003 GB 0318813

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Cyclacel Limited**
6-8 Underwood Street
London N1 7JQ, GB

72 Inventor/es: **Giannella-Borradori, Athos**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Combinación que comprende docetaxel y un inhibidor de CDK.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento del cáncer y otros trastornos proliferativos.

10 Antecedentes de la invención

El inicio, la progresión y la terminación del ciclo celular en los mamíferos están regulados por múltiples complejos de quinasas dependientes de la ciclina (CDK), que son críticos para la proliferación celular. Estos complejos comprenden por lo menos una subunidad catalítica (la CDK propiamente) y una subunidad reguladora (ciclina). Algunos de los complejos más importantes en la regulación del ciclo celular comprenden la ciclina A (CDK1 también conocida como cdc2 y CDK2), ciclina B1-B3 (CDK1), ciclina C (CDK8), ciclina D1-D3 (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6), ciclina E (CDK2), ciclinas K y T (CDK9) y ciclina H (CDK7). Cada uno de estos complejos está implicado en una fase particular del ciclo celular.

La actividad de las CDK está regulada postranslacionalmente, mediante asociaciones transitorias con otras proteínas y mediante alteraciones de su localización celular. El desarrollo de los tumores está próximamente asociado a alteraciones genéticas y la desregulación de las CDK y sus reguladores, lo que sugiere que los inhibidores de las CDK pueden ser agentes terapéuticos antitumorales de utilidad. Desde luego, los resultados iniciales sugirieron que las células transformadas y normales difieren en sus requerimientos de por ejemplo, ciclina A/CDK2 y que podría ser posible desarrollar nuevos agentes antineoplásicos sin la toxicidad general para el huésped observada en los fármacos citotóxicos y citostáticos convencionales.

La función de las CDK es fosforilar y de este modo activar o inactivar ciertas proteínas, que comprenden, por ejemplo, las proteínas de retinoblastoma, lamininas, histona H1 y los componentes de huso mitótico. La etapa catalítica iniciada por las CDK implica una reacción de fosfo-transferencia del ATP a sustrato enzimático macromolecular. Se ha descubierto que múltiples grupos de compuestos [revisados en, por ejemplo, N. Gray, L. Détiavaud, C. Doerig, L., Meijer, *Curr. Med. Chem.* 6:859 (1999)] poseen propiedades antiproliferadoras en virtud del antagonismo al ATP CDK específico.

M.V. Motwani *et al.*, (XP008008541) dan a conocer que la apoptosis inducida por el “docetaxel y la navelvina” está amplificada por el flavopiridol (flavo) en las células de cáncer de mama y es dependiente de la secuencia.

La roscovitina es el compuesto 6-bencilamino-2-[(R)-1-etil-2-hidroxietilamino]-9-isopropilpurina. Se ha demostrado que la roscovitina es un inhibidor potente de los enzimas quinasas dependientes de ciclinas, en particular de CDK2. Este compuesto se está desarrollando en la actualidad como agente antineoplásico. Se entiende que los inhibidores de CDK bloquean el paso de la fase G2/M del ciclo celular.

Está bien establecido en la materia que los agentes farmacéuticos activos pueden administrarse frecuentemente en combinación con el fin de optimizar el régimen de tratamiento. La presente invención busca por consiguiente proporcionar una nueva combinación de agentes farmacéuticos conocidos que sea particularmente adecuada para el tratamiento de los trastornos proliferativos, especialmente el cáncer. Más específicamente, la presente invención se centra en los sorprendentes e inesperados efectos asociados a la utilización en de ciertas combinaciones de agentes farmacéuticos.

50 Exposición de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una combinación que comprende docetaxel, o un derivado del mismo, y roscovitina.

En un segundo aspecto, proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación según la presente invención mezclada con un portador farmacéutico, diluyente o excipiente aceptable.

Un tercer aspecto se refiere a la utilización de una combinación según la presente invención en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo.

Un cuarto aspecto se refiere a un producto farmacéutico que comprende docetaxel o un derivado del mismo y roscovitina como preparación combinada para utilización simultánea, secuencial o por separado en la terapia.

Un quinto aspecto se refiere a un procedimiento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, comprendiendo dicho procedimiento la administración simultánea, secuencial o por separado de docetaxel, o un derivado del mismo, y roscovitina a un sujeto.

Un sexto aspecto se refiere a la utilización de roscovitina en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho tratamiento comprende la administración simultánea, en secuencia o por separado de docetaxel, o un derivado del mismo y roscovitina a un paciente.

- 5 Un séptimo aspecto se refiere a la utilización de docetaxel, o un derivado del mismo y roscovitina en una formulación o medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo.

- 10 Un octavo aspecto se refiere a la utilización de roscovitina en una formulación o medicamento destinado al tratamiento de los desórdenes de la proliferación, en el que dicho medicamento es para su utilización en terapia combinada con docetaxel, o un derivado del mismo.

- 15 Un noveno aspecto se refiere a la utilización de docetaxel o un derivado del mismo, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho medicamento es para la utilización en una terapia combinada con roscovitina.

Descripción detallada de la invención

- 20 El efecto de las combinaciones de fármacos es inherentemente impredecible y frecuentemente existe la propensión a que un fármaco inhiba total o parcialmente el efecto del otro. La presente invención se basa en la sorprendente observación de que la administración de docetaxel y roscovitina en combinación, ya sea a la vez, separadamente o en secuencia, no conduce a interacciones adversas entre los dos agentes. La ausencia inesperada de interacción antagonista alguna entre los dos agentes es crítica para las aplicaciones clínicas.

- 25 Preferentemente, la combinación tiene efectos sinérgicos, es decir, la combinación es sinérgica.

Así, la combinación de docetaxel y roscovitina produce un efecto amplificado en comparación con uno cualquiera de los dos fármacos administrado por separado. La sorprendente naturaleza de esta observación contrasta con lo esperado en base a la técnica anterior.

- 30 Las formas de realización preferidas tal como se describen a continuación son de aplicación en todos los aspectos de la presente invención anteriormente mencionados.

- 35 Docetaxel es un fármaco antineoplásico de la familia del taxano que se prepara mediante la hemisíntesis a partir las agujas renovables del tejo europeo (*Taxus baccata*). El docetaxel se utiliza ampliamente en la clínica con el fin de tratar una multiplicidad de cánceres que comprende el cáncer de mama localmente avanzado o metastático, el cáncer de pulmón localmente avanzado o metastático de célula no pequeña y el cáncer de próstata refractario a hormonas.

- 40 El mecanismo de acción se basa en la interrupción de las redes de microtúbulos que tienen una función esencial en la división celular. Estudios más recientes se han centrado en la utilización del docetaxel como tratamiento de primera línea del cáncer de pulmón de célula no pequeña solo o en combinación, en cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de mama, el cáncer gástrico, el cáncer de próstata y el cáncer de ovario.

- 45 La roscovitina es el compuesto 2-[(1-etil-2-hidroxietil)amino]-6-bencilamina-9-isopropilpurina, también descrito como 2-(1-D,L-hidroximetilpropilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "roscovitina" comprende los enantiómeros R y S resueltos, las mezclas de los mismos y el racemato del mismo.

La actividad *in vitro* de la roscovitina es como se expone a continuación:

50

Quinasa	IC50(PM)
Cdk1/ciclina B	2,7
Cdk2/ciclina A	0,7
Cdk2/ciclina E	0,1
Cdk7/ciclina H	0,5
Cdk9/ciclina T1	0,8
Cdk4/ciclina D1	14,2
ERK-2	1,2
PKA	>50
PKC	>50

55

60

65

El término "trastornos proliferativos" se utiliza en la presente memoria en un sentido amplio incluyendo todo trastorno que necesita el control del ciclo celular, por ejemplo, los trastornos cardiovasculares tales como la restenosis y la

cardiomiopatía, los trastornos autoinmunes tales como la glomerulonefritis y la artritis reumatoide, trastornos dermatológicos tales como la psoriasis, los trastornos antiinflamatorios, antifúngicos, antiparasíticos tales como la malaria, el enfisema y la alopecia. En estos trastornos, los compuestos de la presente invención pueden inducir apoptosis o mantener el éxtasis, en las células deseadas tal como se necesita. Preferentemente, el trastorno proliferativo es un
5 cáncer o leucemia, más preferentemente el cáncer.

En una forma de realización preferida, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula no pequeña o cáncer de próstata.

10 En una forma de realización particularmente preferida, la invención se refiere a la utilización de la combinación anteriormente descrita en la presente memoria en el tratamiento de un trastorno dependiente o sensible a CDK. Los trastornos dependientes de CDK están asociados a un nivel superior al normal de la actividad de uno o más enzimas CDK. Tales trastornos están preferentemente asociados a un nivel anormal de actividad CDK2 y/o CDK4. Un trastorno
15 sensible a CDK es un trastorno en el que la aberración en el nivel de CDK no es la causa principal, pero está corriente abajo de la aberración metabólica principal. En tales escenarios, CDK2 y/o CDK4 se puede decir que son parte de la senda metabólica sensible y los inhibidores de CDK pueden en consecuencia ser activos en el tratamiento de tales trastornos. Dichos trastornos son preferentemente el cáncer o los trastornos de leucemia.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria la frase “preparación de un medicamento” comprende la utilización de los componentes de la presente invención directamente como el medicamento además de su utilización en una etapa cualquiera de la preparación de dicho medicamento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de docetaxel, o un derivado del mismo, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los trastornos proliferativos, en la que dicho medicamento
25 se utiliza en una terapia combinatoria con roscovitina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “terapia combinatoria” se refiere a una terapia en la que el docetaxel, o derivado del mismo, y la roscovitina se administran, si no simultáneamente, en secuencia dentro de un marco temporal en el que los dos están disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo marco temporal.
30

Tal como se mencionó anteriormente, un aspecto de la presente invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende roscovitina y docetaxel como una preparación combinada para utilizar en una terapia simultánea, secuencial o por separado.

35 La roscovitina y el docetaxel (o el profármaco o derivado del mismo) se pueden administrar simultáneamente, en combinación o secuencialmente o por separado (como parte de un régimen de dosis).

Tal como se utiliza en la presente memoria, “simultáneamente” se refiere a que los dos agentes se administran concurrentemente, mientras que el término “en combinación” se refiere a que se administran, si no simultáneamente, entonces “secuencialmente” dentro de un marco temporal en el que los dos están disponibles para funcionar terapéuticamente dentro del mismo marco temporal. Por consiguiente, la administración “secuencial” puede permitir que un agente se administre dentro de los 5 minutos, 10 minutos u horas después del otro, provisto que la vida media en la circulación del agente que se administró primero sea tal que se encuentren los dos presentes concurrentemente en cantidades terapéuticamente efectivas. La diferencia temporal entre la administración de los componentes oscilará dependiendo de la naturaleza exacta de los componentes, la interacción entre los mismos y sus respectivas vidas medias.
45

En contraste con “en combinación” o “secuencialmente”, “separadamente” en la presente memoria se refiere a que la separación entre la administración de un agente y el otro es significativa, es decir, el agente que se administra primero puede no estar presente en la sangre en cantidades terapéuticamente efectivas cuando se administra el segundo agente.
50

En una forma de realización preferida de la presente invención, la roscovitina se administra simultáneamente con el docetaxel.
55

En otra forma de realización preferida, la roscovitina se administra secuencialmente con el docetaxel.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la roscovitina se administra secuencialmente o separadamente antes que el docetaxel. Preferentemente, la roscovitina se administra por lo menos 4 horas antes que el docetaxel, y más preferentemente por lo menos 72 horas antes que el docetaxel.
60

En otra forma de realización preferida, la roscovitina se administra tanto antes que y después de la administración del docetaxel.

65 Así, en una forma de realización especialmente preferida, el docetaxel se administra en una sola inyección i.v. 2 días después de la terapia con roscovitina, seguido de otros 2 días con roscovitina. Más preferentemente, el ciclo se repite después de 14 días.

En una forma de realización particularmente preferida, el docetaxel se administra secuencialmente o separadamente antes de la roscovitina. Preferentemente, el docetaxel se administra por lo menos 1 hora antes de la roscovitina, y más preferentemente por lo menos 24 horas antes del inhibidor de CDK.

- 5 En una forma de realización particularmente preferida, el docetaxel se administra como una sola inyección i.v. 1 día antes de la administración de roscovitina durante 4 días consecutivos. Más preferentemente, se repite el mismo ciclo después de 2 semanas.

- 10 En una forma de realización preferida, la roscovitina y el docetaxel se administran cada uno en cantidades terapéuticamente efectivas con respecto a los componentes individuales; en otras palabras, la roscovitina y el docetaxel se administran en cantidades que serían terapéuticamente efectivas incluso si el componente no se administrase en combinación.

- 15 En otra forma de realización preferida, la roscovitina y el docetaxel se administran cada uno en una cantidad subterapéutica con respecto al componente individual; en otras palabras, la roscovitina y el docetaxel se administran en cantidades que serían terapéuticamente inefectivas si los componentes no se administrasen en combinación.

- 20 Preferentemente, el inhibidor docetaxel y roscovitina interactúan de modo sinérgico. En la presente memoria, "sinérgico" se refiere a que el docetaxel y la roscovitina producen un efecto superior cuando se utilizan en combinación a lo que se esperaría de sumar los efectos individuales de los dos componentes. Ventajosamente, una interacción sinérgica puede permitir que se administre a un paciente una dosis inferior de cada uno de los componentes, disminuyendo de este modo la toxicidad de la quimioterapia, a la vez que se produce y/o mantiene el mismo efecto terapéutico. Así, en una forma de realización preferida, cada componente se puede administrar en cantidades subterapéuticas.

- 25 Las pruebas que confirman la interacción sinérgica se detallan en los ejemplos siguientes.

Sales/ésteres

- 30 Los agentes de la presente invención se pueden preparar como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

- 35 Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la presente invención comprenden las sales de ácidos de adición o bases adecuadas de los mismos. Una revisión de las sales farmacéuticamente adecuadas se puede encontrar en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como los ácidos minerales, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido clorhídrico; con ácidos orgánicos carboxílicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de entre 1 y 4 átomos de carbono que se encuentran no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tales como ácido acético; con ácidos carboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetráftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo aspártico 40 o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos organosulfónicos, tales como los ácidos (C₁-C₄)-alquil- o aril-sulfónicos que se encuentran insustituidos o sustituidos (por ejemplo mediante halógeno) tales como el ácido metan- o p-toluen sulfónico.

- 45 Los ésteres se forman mediante la utilización de ácidos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esterifica. Los ácidos orgánicos comprenden ácidos carboxílicos, tales como los ácidos alcanocarboxílico de entre 1 y 12 átomos de carbono que están sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, mediante halógeno), tales como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetráftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos tales como ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos (C₁-C₄)-alquil- o aril-sulfónicos que pueden estar sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, mediante halógeno) tales como los ácidos metan- o p-toluen-sulfónicos. Los hidróxidos adecuados comprenden hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido cálcico, hidróxido aluminico. 50 Los alcoholes comprenden alcoholes alifáticos de entre 1 y 12 átomos de carbono que pueden estar sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, mediante halógeno).

- 55 *Enantiómeros/tautómeros*

- La presente invención comprende también, cuando apropiado, todos los enantiómeros y tautómeros de los agentes. El experto en la materia apreciará los compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono 60 quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes se pueden aislar/preparar mediante procedimientos conocidos en la materia.

Isómeros geométricos y estereoisómeros

- 65 Algunos de los agentes de la presente invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o centros geométricos y por consiguiente pueden existir en dos o más formas de estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla la utilización de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de los agentes inhibidores y las mezclas de los mismos. Los

términos utilizados en las reivindicaciones comprenden estas formas, con la condición de que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

La presente invención comprende también todas las modificaciones isotópicas adecuadas del agente o fármaco sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Como modificación isotópica de un agente de la presente invención o sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define aquella en la que por lo menos un átomo se sustituye con un átomo con el mismo número atómico pero diferente masa atómica a la generalmente encontrada en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en el agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo comprenden isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, fluoro y cloro tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl respectivamente. Ciertas modificaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radioactivo tal como ^3H o ^{14}C , son de utilidad en estudios de distribución del fármaco y/o sustrato en los tejidos. Los isótopos tritados, es decir, ^3H y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos debido a su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, las sustituciones adicionales con isótopos tales como deuterio, es decir, ^2H , pueden permitir ciertas ventajas terapéuticas resultantes de su superior estabilidad metabólica terapéutica, por ejemplo, el incremento de la vida media *in vivo* o la necesidad de dosis reducida y por consiguiente pueden ser preferidos en ciertas circunstancias. Las modificaciones isotópicas del agente de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se pueden preparar en general mediante procedimientos convencionales utilizando modificaciones isotópicas de reactivos adecuados.

Solvatos

La presente invención comprende también formas solvatadas de los agentes de la presente invención. Los términos utilizados en las reivindicaciones comprenden dichas formas.

Polimorfos

La presente invención se refiere además a agentes de la presente invención en múltiples formas cristalinas, formas polimórficas y formas anhidras. Está bien establecido en la industria farmacéutica que los compuestos químicos se pueden aislar en una cualquiera de tales formas mediante ligeras modificaciones del procedimiento de purificación y el aislamiento de los disolventes utilizados en la preparación por síntesis de dicho compuestos.

Derivados químicos

El término "derivado" se refiere a modificaciones químicas de uno o más de los agentes de la presente invención. Son ilustrativos de tales modificaciones químicas la sustitución de hidrógeno por un grupo halo, un grupo alquilo, un grupo acilo o un grupo amino.

Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden adaptar para la administración por vía oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intracecal, intrabronquial, subcutánea, intradermal, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

Para la administración oral, se hace utilización particular de tabletas comprimidas, píldoras, pastillas grageas, gotas y cápsulas. Preferentemente, estas composiciones comprenden entre 1 y 2.000 mg y más preferentemente entre 50 y 1.000 mg del ingrediente activo por dosis.

Otras formas de administración comprenden disoluciones o emulsiones que se pueden inyectar intravenosamente, intraarterialmente, intracecalmente, subcutáneamente, intradermalmente, intraperitonealmente o intramuscularmente y que se preparan a partir de disoluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden también formar en supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, rociados, disoluciones o polvos para espolvorear.

Unos medios alternativos de administración transdermal es mediante un parche cutáneo. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede incorporar en una crema que comprende una emulsión acuosa de polietilenglicol o parafina líquida. El ingrediente activo se puede incorporar también, a una concentración comprendida entre el 1 y el 10% en peso, en un ungüento que comprende una base de cera blanca o parafina blanca blanda junto con los estabilizadores y conservantes que se puedan necesitar.

Las formas inyectables pueden comprender entre 10 y 1.000 mg, preferentemente entre 10 y 500 mg de ingrediente activo por dosis.

Las composiciones se pueden formular en formas de dosis unitarias, es decir, en forma de porciones discretas que comprenden una unidad de dosis, o un múltiplo o sub-unidad de la dosis unitaria.

En una forma de realización particularmente preferida, la combinación o composición farmacéutica de la presente invención se administra intravenosamente.

Dosificación

Un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas que se debe administrar a un sujeto sin experimentación innecesaria. Típicamente, un médico determinará la dosis verdadera que resultará más adecuada para un paciente individual y dependerá de múltiples factores que comprenden la actividad del compuesto específico utilizado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de tal compuesto, la edad, peso corporal, salud general, género, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, gravedad del estado particular del paciente y el individuo que sufre la terapia. Las dosis dadas a conocer en la presente memoria son ejemplos de la dosis promedio. Desde luego pueden existir situaciones individuales que merecen dosis más elevadas o inferiores y que están comprendidas en el alcance de la presente invención.

Dependiendo de la necesidad, el agente se puede administrar a una dosis comprendida entre 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, tal como entre 0,1 y 10 mg/kg, más preferentemente entre 2 y 20 mg/kg de peso corporal.

Como guía, el docetaxel se administra típicamente bajo el consejo de un médico a dosis comprendidas entre 60 y 100 mg/m² de superficie corporal, intravenosamente durante una hora cada 21 días o a una dosis comprendida entre 20 y 40 mg/m² intravenosamente durante una hora cada semana durante hasta 6 meses. Las dosis y las frecuencias de aplicación típicamente se adaptan al estado médico general del paciente y a la gravedad de los efectos adversos tales como reacciones de hipersensibilidad y a los efectos adversos provocados en el sistema hematopoyético y el sistema nervioso.

La roscovitina se administra típicamente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 g/día, preferentemente entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 3 g/día. La roscovitina se administra preferentemente oralmente en comprimidos o cápsulas. La dosis diaria total de roscovitina se puede administrar en una sola dosis o dividida en dosis separadas administradas dos, tres o cuatro veces al día.

Preferentemente, la roscovitina se administra oralmente o intravenosamente a una dosis comprendida entre 0,4 y 3 g/día. El docetaxel se administra a continuación en la forma considerada más adecuada a una dosis apropiada tal como se expuso anteriormente. Preferentemente, el docetaxel se administra por lo menos 24 horas después de la administración de roscovitina.

La presente invención se describe además mediante Ejemplos y haciendo referencia a las Figuras siguientes en la presente memoria:

La Figura 1 muestra el efecto de una preexposición de 24 horas a roscovitina seguida de una exposición a docetaxel de 24 horas.

La Figura 2 muestra el efecto de la administración de roscovitina (CYC-202) y docetaxel (taxotere) sobre el tamaño del tumor en un xenotransplante de cáncer de mama primario MAXF 857. Con mayor detalle, la Figura 2 muestra el volumen medio relativo de tumor contra el tiempo (días después de la aleatorización para tratamientos con solo roscovitina, solo docetaxel y combinación roscovitina/docetaxel contra control.

Las Figuras 3A y 3B muestran el efecto de la programación de docetaxel/roscovitina en un xenotransplante de cáncer de pulmón (LXFL H460). Con más detalle, la Figura 3 muestra el volumen medio relativo de tumor contra el tiempo (días después del inicio del tratamiento) para docetaxel solamente, roscovitina solamente, y múltiples programas de roscovitina/docetaxel.

Ejemplos

La actividad inhibitoria del crecimiento de la roscovitina se midió sola y en combinación con docetaxel contra la línea celular de tumor de mama MDA-435 y la de tumor de próstata PCM-3 utilizando un ensayo en monocapa y un ensayo de célula progenitora tumoral.

*Materiales y métodos**Compuesto*

Se preparó disolución reservorio de inhibidor de CDK (por ejemplo roscovitina) en DMSO y se almacenaron alícuotas a -20°C. Las diluciones finales se prepararon en medio de cultivo (modificación Iscove del Medio Modificado de Dulbecco; Life Technologies, Karlsruhe) inmediatamente antes de la utilización.

*Ensayo clonogénico**Preparación de suspensiones de una sola célula a partir de xenotransplantes de tumor humano*

Xenotransplantes de tumores sólidos humanos crecidos subcutáneamente en pases sucesivos en ratones desnudos de timo aplásico (NMRI, Naval Medical Research Institute, USA, cepa nu/un, obtenidos de una institución de crianza)

ES 2 318 202 T3

se extrajeron en condiciones de esterilidad, se desagregaron mecánicamente y se incubaron a continuación con un cóctel de enzimas que comprende colagenasa (41 U/ml, Sigma), ADNasa I (125 U/ml, Roche), hialuronidasa (100 U/ml, Sigma) y dispasa II (1,0 U/ml, Roche) en medio RPMI 1640 (Life Technologies) a 37°C durante 30 minutos. Las células se pasaron a través de una malla de tamaño 200 μm y 50 μm y se lavaron dos veces en tampón PBS estéril (Life Technologies). El porcentaje de células viables se determinó en una cámara Neubauer utilizando exclusión de azul trypan.

Procedimientos de cultivo

El ensayo clonogénico se realizó en un formato de 24 pocillos según una modificación de ensayo de dos capas de agar blando introducida por Hamburger & Salmon (Alley, M.C., Uhi, C.B. & M.M. Lieber, 1982). Detección mejorada de citotoxicidad de fármaco en el ensayo de formación de colonias en agar blando mediante la utilización de una sal de tetrazolium metabolizable (*Life Sci.* 31:3071-3078). La capa del fondo comprendió 0,2 ml/pocillo de modificación Iscove del Medio Modificado de Dulbecco (suplementado con 20% (vol/vol) de suero bovino fetal y 0,01% (vol/vol) gentamicina) y 0,75% (peso/vol) agar. Se añadieron entre 4×10^4 y 8×10^4 células a 0,2 ml del mismo medio de cultivo suplementado con 0,4% (peso/vol) de agar y se sembraron en la capa del fondo de placas de 24 pocillos. Los fármacos citostáticos se aplicaron mediante exposición continua (superposición de fármaco) en 0,2 ml de medio de cultivo. Cada placa comprendió 6 pocillos control comprendiendo grupos tratados con el vehículo y fármaco por triplicado a 6 concentraciones. Los cultivos se incubaron a 37°C y 7,5% CO_2 en una atmósfera húmeda durante entre 8 y 20 días y se realizó un seguimiento para determinar el crecimiento de colonias utilizando un microscopio invertido. Durante este período, el crecimiento *in vitro* del tumor condujo a la formación de colonias de diámetros $>50 \mu\text{m}$. En el momento de máxima formación de colonias, se realizaron contajes mediante un sistema de análisis de imagen automático (OMNICON FAS IV, Biosys GmbH). Veinticuatro horas antes de la evaluación, se tiñeron las colonias vivas mediante disolución acuosa estéril de cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium (1 mg/ml, 100 μl /pocillo) [i].

Se consideró que un ensayo era totalmente evaluable si se cumplían los siguientes criterios de control de calidad:

- El número medio de colonias en los pocillos del grupo control de las placas de 24 pocillos ≥ 20 colonias con un diámetro de colonia $>50 \mu\text{m}$.
- El control de referencia positiva 5-fluorouracilo (5-FU) (a la dosis tóxica de 1.000 $\mu\text{g/ml}$) debe producir una supervivencia de colonias $<20\%$ de los controles.
- El número inicial de cuentas de placas el día 0 ó 2 es $<20\%$ de la cuenta final del grupo control.
- El coeficiente de variación en el grupo control es $\leq 50\%$.

Evaluación de los datos

Los efectos del fármaco se expresaron en términos del porcentaje de supervivencia, obtenido mediante la comparación del número medio de colonias en las placas tratadas con el número medio de la cuenta de colonias de los controles no tratados (la cuenta relativa de colonias expresada mediante el valor ensayo-contras grupo control, T/C-valor [%]):

$$\frac{T}{C} = \frac{\text{Cuenta de colonias}_{\text{grupo tratado}}}{\text{Cuenta de colonias}_{\text{grupo control}}} \times 100 [\%]$$

Los valores IC50 e IC70, la concentración de fármaco necesaria para inhibir la formación de colonias en un 50% (T/C = 50%) y 70% (T/C = 30%) respectivamente, se determinaron haciendo una gráfica de la concentración de compuesto contra la cuenta relativa de colonias. Los valores medios de IC50 e IC70 se calcularon según la fórmula

$$\text{media IC}_{50,70} = 10^{\left(\frac{\sum_{i=1}^n \lg(\text{IC}_{50,70})}{n} \right)}$$

Siendo X el modelo específico de tumor y n el número total de modelos de tumor estudiados. Si no se pudo determinar un valor de IC50 o IC70 dentro del intervalo de dosis examinado, se utilizó en el cálculo la concentración superior o inferior estudiada.

En el análisis gráfico medio (gráfica IC) la distribución de valores IC70 obtenida en el ensayo de un compuesto en los tipos de tumores individuales se proporciona en relación al valor IC70 medio, obtenido para todos los tumores ensayados. Los valores individuales IC70 se expresan como barras en un eje de escala logarítmica. Las barras a la izquierda demuestran valores IC70 inferiores al valor medio (indicando los modelos tumorales más sensibles), las barras a la derecha demuestran valores elevados (indicando modelos tumorales más bien resistentes). La gráfica IC por consiguiente representa una huella del perfil antiproliferativo del compuesto.

*Procedimiento de ensayo: Combinación de roscovitina con agentes estándares**Líneas celulares*

5 Las características de las 6 líneas tumorales humanas se muestran en la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

10 *Líneas celulares utilizadas para ensayar roscovitina en combinación con agentes estándares*

10

	Formación de tipo tumoral	Línea celular	Histología en ratones desnudos	Tiempo de duplicación (h)	Tumor <i>in vivo</i>
15	Colon	DLD1	adeno ca	nd	Sí
		HT29	pd adeno ca	23	Sí
	Pulmón, NSC	LXFA 629L	adeno carcinoma	31	Sí
	Próstata	22RV1	nd	40	Sí
20		DU145	adeno ca	nd	Sí
		PC3M	pd adeno ca	nd	Sí

25 ud = indeferenciado, pd = poco diferenciado, md = moderadamente diferenciado,

25

wd = bien diferenciado, mm = melanoma maligno; ND = no determinado

30 La línea de carcinoma pulmonar LXFA 629L se estableció a partir de un xenotransplante de tumor humano tal como describieron Roth *et al.*, 1999 [Roth T, Burger AM, Dengler W, Willmann H, Flebig HH, Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. En: Fiebig HH, Burger AM (eds). Relevance of tumor models for anticancer drug development. *Contrib. Oncol.* 54:145-156 (1999)]. El origen de los xenotransplantes donantes fue descrito por Fiebig *et al.*, 1992 [Fiebig HH, Dengler WA, Roth T, Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents. En: Fiebig HH, Burger AM (eds). Relevance of tumor models for anticancer drug development, *Contrib. Oncol.*, 54:29-50 (1999)].

35 Las líneas celulares DLD1 y HT29 (colon), así como también los carcinomas de próstata DU145 y PC3M se obtuvieron de US-NCI (National Cancer Institute USA).

40 El carcinoma de próstata 22RV1 se compró de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las células se pasaron rutinariamente una o dos veces por semana. Se mantuvieron por no más de 20 pases en cultivo. Todas las células se crecieron a 37°C en una atmósfera húmeda (95% aire, 5% CO₂) en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con 10% suero bovino fetal (Sigma, Deisenhofen, Alemania) y 0,1% gentamicina (Invitrogen).

45

Ensayo de proliferación celular

Se utilizó un ensayo modificado de yoduro de propidio con el fin de ensayar los efectos de la roscovitina sobre el crecimiento de las líneas tumorales humanas [Dengler WA, Schulte J, Berger DP *et al.* (1995). Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. *Anti-Cancer Drugs*, 6:522-532 (1995)]. En breve, se cosecharon las células de cultivos en fase exponencial mediante tripsinización, se contaron y se sembraron en placas microtiter de fondo plano de 96 pocillos a una densidad celular dependiente de la línea celular (5 a 12.000 células viables/pocillo). Después de 24 h de recuperación para permitir que las células reasumiesen crecimiento exponencial se añadió a cada pocillo 20 µl de medio de cultivo (3 pocillos control por placa) o medio de cultivo con múltiples concentraciones del artículo de ensayo n° 1 (agente estándar). Cada concentración se sembró por triplicado. En cada ensayo se aplica artículo de ensayo n° 1 a cinco concentraciones, 4 tiempos en 4 cuartos de placa microtiter. El Cuarto 1 fue para el artículo de ensayo n° 1 solamente, en los Cuartos 2 a 4 se aplico el artículo n° 2 (roscovitina) a tres puntos de tiempo diferentes, respectivamente. Después de 4 días de exposición continua al artículo de ensayo, se reemplazó el medio de cultivo celular con o sin fármaco por 200 µl de una disolución acuosa de yoduro de propidio (PI) (7 µg/ml). Debido a que el PI solo pasa a través de membranas celulares porosas o rotas, se puede teñir y medir el ADN de las células muertas, mientras que las células vivas no se tiñen. Con el fin de medir la proporción de células vivas, las células se permeabilizan congelando las placas, lo que produce la muerte de las célula. Después de descongelar las placas se midió la fluorescencia utilizando un lector de microplacas Cytofluor 4000 (excitación 530 nm, emisión 620 nm), lo que da una relación directa al número total de células. La inhibición del crecimiento se expresó como tratado/control x 100 (%T/C) y se determinaron los valores IC₅₀, IC₇₀ e IC₉₀ para cada combinación mediante una gráfica de la concentración del compuesto contra la viabilidad celular.

65

Ensayo MTT

El ensayo MTT se utilizó con el fin de evaluar los efectos de la roscovitina con y sin docetaxel. El ensayo MTT es un ensayo espectrofotométrico basado en la capacidad de las células viables para convertir MTT en formazano. Las concentraciones de células se estimaron mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y a una longitud de onda de referencia de 630 nm. Se utilizó un procedimiento automatizado para determinar el valor IC₅₀ (concentración de fármaco que inhibe el crecimiento en un 50% del control) de todos los agentes utilizados en estos estudios. Se seleccionaron líneas celulares con posibilidades específicas en mente para el diseño de ensayos clínicos futuros. Inicialmente, la roscovitina y el docetaxel se ensayaron separadamente sobre un rango de concentraciones. Después de haber completado el análisis IC₅₀ inicial, se ensayaron las combinaciones. Para los estudios de combinaciones, el esquema de concentración (expresada como el porcentaje del IC₅₀ del agente individual) que se utilizó para caracterizar el tipo de interacciones se muestra a continuación:

Concentración de fármaco (expresada como el porcentaje de IC₅₀)

Roscovitina	Docetaxel
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

Análisis estadístico de los estudios de combinación

Con el fin de interpretar las curvas de combinación, se hicieron comparaciones estadísticas con cada una de las combinaciones de ensayo (75:25 roscovitina/docetaxel) y los puntos finales (100:0-roscovitina y 0:100-docetaxel). Una observación de significancia estadística requiere que exista una diferencia entre el valor de la absorbancia para la combinación (roscovitina y docetaxel) y los dos puntos finales (roscovitina y docetaxel por si solos) [Greco *et al.*, The search for synergy; A critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Review*, 47:331-385 (1995); Laska *et al.*, Simple designs and model-free tests for synergy; *Biometrics*, 50:834-841 (1994)]. Si la mayoría de (≥ 3 de 5) de los valores son estadísticamente superiores o inferiores a la línea (puntos finales) entonces se describe antagonismo o sinergia, respectivamente. De otro modo el patrón concuerda con una interacción aditiva.

*Resultados**Exposición a roscovitina seguida de docetaxel*

En estos estudios, se preexpusieron células de tumor de mama (MDA-435) durante 24 horas a roscovitina seguido de 24 horas de exposición a docetaxel (Tablas 2 y 3, Figura 1). Esta secuencia de exposiciones a los dos agentes produjo un patrón que sugiere una interacción sinérgica entre estos agentes.

TABLA 2

Concentración								
% IC50	Roscovitina (µg/ml)	Tax. (ng/ml)	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Media	% Absorbancia	% Respuesta
0/0	0	0	1,321	1,410	1,305	1,345	100,0	
100/0	15	0	0,775	0,740	0,775	0,763	0	43,3
75/25	11,25	0,45	0,439	0,425	0,492	0,452	56,7	66,4
60/40	9	0,72	0,159	0,191	0,216	0,189	33,6	86,0
50/50	7,5	0,9	0,165	0,154	0,174	0,164	14,0	87,8
40/60	6	1,08	0,268	0,190	0,302	0,253	12,2	81,2
25/75	3,75	1,35	0,875	0,782	0,961	0,873	18,8	35,1
0/100	0	1,8	0,873	0,771	0,749	0,798	64,9 59,3	40,7

TABLA 3

	p-valores 100/0	p-valores 0/100
100/0		
75/25	0,00018771624	0,00133536059
60/40	0,00000909306	0,00012676295
50/50	0,00000133568	0,00008105605
40/60	0,00013113980	0,00042261143
25/75	0,10803231506	0,30804956660
0/100		

Estudios de xenotransplantes humanos

Se investigó la función de la roscovitina en combinación con docetaxel en xenotransplantes de tumores humanos *in vivo*. La línea NCI H460, derivada de cáncer de pulmón humano se creció subcutáneamente como un xenotransplante en ratones desnudos inmunodeprimidos. Se enfatizaron en diferentes programas de combinación de roscovitina y docetaxel.

Información de los animales

Información específica

Cepa de ratón: NMRI nu/nu

Animal proporcionado por: Institute of Experimental Oncology, Oncotest, GmbH, Freiburg, Alemania

Género del ratón: machos y hembras

Peso corporal medio cuando son aleatorizados: hembras: 28-32 g
machos: 30-36 g

Edad aproximada cuando son aleatorizados: 6-9 semanas

Salud de los animales y período de aclimatación

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías del German Animal Health Welfare Act (Tierschutzgesetz).

Se examinó la salud de los animales el día anterior a la implantación de los tumores y después de la aleatorización con el fin de asegurar que solo se seleccionaban animales con buena salud para ser admitidos en los procedimientos de ensayo.

Agrupamiento y aleatorización de los animales

Se numeraron los animales arbitrariamente durante la implantación de los tumores utilizando un perforador de oreja. El día anterior a la primera administración de un compuesto los animales con tumores se estratificaron en múltiples grupos según el volumen de los tumores. Solamente los animales con un volumen de tumor adecuado se seleccionaron y distribuyeron aleatoriamente a grupos tratado y control. La aleatorización se realizó según las "Linden's Randomization Tables". Cada grupo comprendió entre 6 y 9 animales. Los volúmenes de los tumores al principio del tratamiento fueron de 86 mm³ para los PC3M, 103 mm³ para los DU145, 186 mm³ para los MAXF 857 y 75 mm³ para los LXFL H460.

Identificación de los animales

Una etiqueta en la oreja identificó a cada uno de los ratones. Al principio del estudio, cada caja se marcó con una etiqueta de registro, que indicaba el número de experimento, la fecha de la implantación de los tumores, la fecha de la aleatorización, tipo de tumor, número de tumor, cepa de ratón, género y número de individual de animal. Después de la aleatorización se añadió la identidad de grupo, compuesto de ensayo, dosis, programa y ruta de administración.

*Condiciones de mantenimiento**Conservación*

5 Los animales se estabularon en cajas Macrolon^M tipo III con cubiertas de filtro (máximo 8 ratones/jaula) en estantes de flujo laminar. Las cajas se colocaron en habitaciones separadas de Oncotest. Las cajas se esterilizaron a 121°C antes de su utilización y se cambiaron dos veces por semana. La temperatura ambiente se mantuvo a 24 ± 1°C y la humedad relativa a 50 ± 10%. Los animales se mantuvieron en un ciclo natural de luz diurna.

10 *Dieta y agua*

Los animales se alimentaron con dieta para ratones/ratas Altromin Extrudat 1439. La dieta se adquirió de Altromin GmbH (Lage, Alemania).

15 El agua se esterilizó a 121°C durante 30 minutos. Después de la esterilización se añadió 0,9 g/l de sorbato potásico, el pH se ajustó a 2 con 1N HCl. El consumo de agua se siguió visualmente a diario, se cambiaron los biberones dos veces por semana. La comida y fueron proporcionados *ad libitum*.

20 *Lecho*

Se utilizó lecho S 8/15 para animales producido por Rettenmaier & Söhne Faserstoffwerke (Ellwangen-Holzmühle, Alemania). El lecho se esterilizó a 130°C durante 15 minutos y se renovó dos veces por semana. El lecho lo administró E. Müller (Forchheim, Alemania).

El productor analiza el lecho libre de polvo cada 3 meses con respecto a contaminación biológica/fúngica y el contenido en ésteres de fosfato, arsénico, cadmio, plomo y mercurio. Estos análisis se realizan en el Agriculture Analyses and Research Institute, Ministry of Agriculture, Kiel, Alemania. Los certificados de calidad se depositan en el Rettenmaier & Söhne Fasestoffwerke (Ellwangen-Holzmühle, Alemania).

Información de los tumores

35 *Caracterización del modelo tumoral*

La línea de tumor de pulmón humano H460 se obtuvo de US National Cancer Institute. Esta línea de células tumorales se estableció *in vivo* mediante inyecciones subcutáneas in animales desnudos y se propagaron los tumores hasta que se obtuvo un comportamiento de crecimiento estable.

40 MAXF 857 se estableció a partir de pacientes tratados en el departamento de medicina interna, University of Freiburg. Se estableció mediante la implantación de tejido de un paciente en un ratón desnudo y se propagaron los tumores hasta que se observó un comportamiento de crecimiento estable. Se congelaron en nitrógeno líquido reservorios maestros de los pasajes iniciales. Un lote de reservorio maestro individual se utiliza solamente por aproximadamente 10 pases.

Implantación de los xenotransplantes humanos

50 Se obtuvieron fragmentos de los pases en serie en ratones desnudos. Después de la extracción del tumor de los ratones donantes, se cortó el tumor en fragmentos (1 a 2 mm de diámetro) y se colocaron en medio de cultivo RPMI 1640 hasta la implantación subcutánea en ratones.

Los animales se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano. Se realizó una pequeña incisión en la piel de la espalda. Los fragmentos de tumor (dos fragmentos por ratón) se trasplantaron con pinzas. Los ratones se siguieron a diario.

Sustancias a ensayar

60 Roscovitina (proporcionada por Cyclacel Ltd) se almacenó a 4°C en la oscuridad. La sustancia se disolvió en un tampón con 50 mM HCl y 0,05% Tween 80. Se prepararon disoluciones frescas diariamente. Los compuestos de referencia se prepararon como se expone a continuación: Docetaxol (Taxotere[®], Aventis) se utilizó como formulación clínica.

65

Procedimiento de tratamiento

Vía de administración

5 La roscovitina y el vehículo (50 mM HCl y 0,05% Tween 80) se administraron oralmente. Taxotere se administró i.v.

Dosis de fármaco y régimen de tratamiento

10 El compuesto a ensayar roscovitina se administró a dosis de entre 300 y 150 mg/kg/día durante por lo menos tres días. El segundo ciclo de tratamiento se realizó una o dos semanas después del primer ciclo. La dosis diaria se dividió y se administró a las 0 y 6 horas. El Taxotere se administró a la dosis y protocolo óptimo (20 mg/kg). Los agentes antineoplásicos estándares se administraron 15 minutos antes de la aplicación de roscovitina cuando se administraron en el mismo día.

Los ratones control recibieron vehículo (10 mg/kg/día) utilizando el protocolo de administración de la roscovitina.

20 El MTD se definió como la tolerancia de una pérdida media de peso corporal de aproximadamente el 15% del peso inicial en las 2 semanas después de la última administración de fármaco y la muerte de 1 animal de cada 3 relacionada al fármaco.

Observaciones

Mortalidad

Se realizaron comprobaciones de mortalidad a diario. La mortalidad se consideró relacionada al fármaco cuando ocurrió hasta 7 días después de la última terapia.

Peso corporal

35 Se determinó el peso corporal de los ratones dos veces por semana, es decir, el mismo día que se midieron los tumores.

El peso corporal de un grupo de tratamiento se expresó como el peso corporal absoluto y relativo a la media de todos los animales del grupo. El peso corporal medio relativo de cada animal individual se calculó según la fórmula:

$$40 \quad \text{Peso corporal relativo} = \frac{\text{peso corporal día}_x}{\text{peso corporal día}_0} \times 100$$

Volumen tumoral

El volumen tumoral se determinó mediante medición de dos dimensiones con un calibre el día de la aleatorización (día 0) y dos veces por semana. El volumen de los tumores se calculó según la fórmula: $(a \times b^2) \times 0,5$

50 a y b representan dos diámetros perpendiculares del tumor: a, el diámetro grande, b, el más pequeño.

Punto final del estudio

55 Todos los ratones de un grupo tratado se tuvieron que sacrificar cuando los tumores alcanzaron un diámetro medio de aproximadamente 16 mm (2,0 g) según las guías para la realización de experimentos con animales.

Los grupos de ensayo se terminaron cuando el volumen inicial de los tumores de 100 mm³ hubo aumentado por lo menos 4 veces.

Actividad antitumoral

65 El efecto antitumoral se valoró después de la máxima inhibición del tumor respecto al grupo control. La valoración de los dato se realizó utilizando software especialmente diseñado.

Volumen tumoral relativo

El volumen tumoral relativo (RTV) se calculó para cada tumor individual mediante la división el volumen del tumor el día X (V_x) entre el volumen del tumor el día 0 (V_0) multiplicado por 100%. El volumen tumoral de un grupo de tratamiento se expresó como el RTV medio de todos los ratones del grupo. Los valores RTV medios se utilizaron para trazar curvas de crecimiento y la evaluación del tratamiento.

Tiempo de doblaje del tumor

El tiempo de doblaje del tumor (T_d) de los grupos de ensayo y control se define como el tiempo (días) requerido en días para alcanzar una RTV media del 200%.

Inhibición del tumor, Valor Test/Control en %

La inhibición óptima del crecimiento en un día en particular dentro del grupo experimental se calculó a partir de los valores RTV medios de los grupos de ensayo contra controles multiplicado por 100 (T/C en %).

El volumen tumoral relativo T_x/T_0 se define como se expone a continuación:

$$T_x/T_0 = \frac{\text{volumen tumoral medio relativo del grupo de ensayo el día}_x}{\text{volumen tumoral medio relativo del grupo de ensayo el día}_0} \times 100$$

Retraso absoluto de crecimiento

El retraso absoluto de crecimiento se define como la diferencia en días T_d (ensayo)- T_d (control).

Criterio de eficacia

El valor T/C mínimo (u óptimo) registrado para un grupo de ensayo particular representa la máxima actividad antitumoral del tratamiento respectivo.

T/C % y T_x/T_0 se utilizaron para calificar la actividad de los niveles de eficacia, que se definieron como sigue:

-	Inactivo	T/C $\geq 50\%$
+	Actividad moderada	T/C $25\% < 50\%$
++	Actividad elevada	T/C $10\% < 25\%$
+++	Actividad muy elevada	T/C $5\% < 10\%$
++++	Remisión completa	T/C $< 5\%$

Resultados de los estudios con xenotransplantes de tumores humanos

Experimento 1

En la Figura 2 se muestra el efecto de la administración de roscovitina (CYC-202) y docetaxel (taxotere) sobre el tamaño del tumor en un xenotransplante de cáncer primario de mama (MAXF 857). Los ratones con xenotransplantes MAXF 857 se trataron con taxotere como único agente el día 2 después de la aleatorización, o se trataron con roscovitina como único agente los días 0 a 3 y 7 a 9 después de la aleatorización, o con la combinación de los dos tratamientos. La combinación de roscovitina con taxotere mostró una sinergia pronunciada. La combinación fue notablemente más activa (T/C óptima de 2%) que la monoterapia (T/C óptima de 63% y 21%). Este efecto fue estadísticamente significativo con $p < 0,001$ (Ensayo U de Mann-Whitney-Wicox en el día 24).

Experimento 2

En las Figuras 3A y 3B y en la Tabla 4 a continuación, se muestra el protocolo taxotere/roscovitina en un xenotransplante de cáncer de pulmón (LXFL H460).

TABLA 4

Calendario de combinación	Días tras la aleatorización																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
control	v	v	v	v	v			v	v	v	v	v			v	v	v	v	v						
CYC202																									
TXT																									
1	TXT																								
	/CYC202																								
2	TXT																								
	/CYC202																								
3	TXT																								
	/CYC202																								
4	TXT																								
	/CYC202																								

v. vehículo; CYC202 administrado bd (150 mg/kg/inyección) produciendo 300 mg/kg/d, po: docetaxel administrado a 20 mg/kg, iv

Los valores de toxicidad y T/C se muestran a continuación en la tabla 5.

TABLA 5

Combinación	Terapia	Nivel de dosis [mg/kg/d]	Calendario [día]	Mortalidad n (día)*	CPC medio en % (día 21)**	T/C [%] día 28	T/C _{opt} [%] / día _{opt}
	Control		bd 0-4,7-11,14-18	0/10	+ 6,2	100	100 / -
	CYC202	300	bd 0-4,7-11,14-18	0/10	+ 7,1	64,3	64,3 / 28
	TXT	20	0,14	0/10	- 4,2	27,3	12,2 / 10
1	TXT/ CYC202	20/ 300	0,14/ bd 1-4,15-18	0/10	- 7,1	3,3	2,9 / 24
2	TXT/ CYC202	20/ 300	4,18/ bd 0-3,14-17	0/10	- 5,2	38,9	32,2 / 10
3	TXT/ CYC202	20/ 300	2,16/ bd 0-1,3-4,14-15,17-18	0/10	- 11,5	14,1	11,3 / 10
4	TXT/ CYC202	20/ 300	0,14/ bd 7-10,21-24	0/10	- 11,0	35,6	11,8 / 10

* días en los que ocurrió la mortalidad

** cambio en peso corporal una semana después de la terapia con docetaxel

Mientras que la roscovitina como agente único demostró ejercer una ligera acción antitumoral (300 mg/kg durante 4 de días tratamiento, T/C = 64%), el compuesto a la misma dosis incrementó la eficacia del docetaxel (20 mg/kg, dos inyecciones únicas a intervalos de 2 semanas, T/C = 27%) de modo dependiente del protocolo.

Se obtuvieron los mejores efectos (y un efecto marcadamente sinérgico) cuando el docetaxel se administró en una sola inyección i.v. un día antes de la administración de roscovitina dada durante 4 días consecutivos, y el mismo ciclo repetido después de 2 semanas (Programa 1; T/C = 3%). El retraso del crecimiento tumoral con estas combinaciones en relación con los controles tratados con vehículo fue > 32 días en comparación con 9 días con docetaxel en una sola terapia. Este programa también condujo a un efecto antitumoral prolongado. El tiempo de duplicación del tumor fue aproximadamente 28 días en comparación con 3 días para el control.

ES 2 318 202 T3

Se obtuvo un ligero beneficio cuando se administró docetaxel como una sola inyección después de 2 días de terapia con roscovitina, seguido de otros 2 días con roscovitina, el ciclo se repitió después de 14 días (Programa 3; T/C = 14%).

5 El programa con docetaxel administrado una semana antes de los 4 días de tratamiento con roscovitina y el mismo ciclo administrado 2 semanas más tarde, no mostró sinergia (Programa 4; T/C = 36%).

10 Los beneficios inferiores se obtuvieron dando una sola inyección de docetaxel después de haber dado roscovitina durante 4 días consecutivos (2 ciclos con un intervalo de 10 días) (Programa 2; T/C = 40%). Durante el estudio no hubo toxicidad pronunciada.

15 En las terapias de combinación, la pérdida de peso fue ligeramente más pronunciada que en la terapia única (hasta un 12% del peso medio inicial), pero estuvo dentro del intervalo aceptable. La dependencia del programa ha probado por consiguiente ser muy crítica, con los mejores resultados obtenidos cuando el docetaxel se dio poco después de un ciclo de roscovitina, es decir, un día antes de la roscovitina.

20 Como resumen, los resultados demuestran que la administración de docetaxel en combinación con roscovitina produce un efecto amplificado en comparación con cada uno de los fármacos administrados solos, o simultáneamente. Este efecto es indicativo de una interacción sinérgica entre los dos componentes.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Combinación que comprende docetaxel, o un derivado del mismo, y roscovitina.

2. Composición farmacéutica que comprende una combinación según la reivindicación 1 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Utilización de una combinación según la reivindicación 1 ó 2, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo.

4. Producto farmacéutico que comprende docetaxel, o un derivado del mismo, y roscovitina, como una preparación combinada para la utilización simultánea, secuencial o por separado en terapia.

5. Producto farmacéutico según la reivindicación 4, en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. Producto farmacéutico según la reivindicación 4 ó 5, destinado a la utilización en el tratamiento de un trastorno proliferativo.

7. Producto farmacéutico según la reivindicación 6, en el que el trastorno proliferativo es el cáncer.

8. Producto farmacéutico según la reivindicación 7, en el que el cáncer es el cáncer de próstata.

9. Utilización de roscovitina en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, en la que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto simultáneamente, secuencialmente o por separado docetaxel, o un derivado del mismo, y roscovitina.

10. Utilización de roscovitina y docetaxel, o un derivado del mismo, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo.

11. Utilización de roscovitina en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, en la que dicho medicamento está destinado a la utilización en una terapia de combinación con docetaxel, o un derivado del mismo.

12. Utilización de docetaxel, o un derivado del mismo, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, en la que dicho medicamento está destinado a la utilización en una terapia de combinación con roscovitina.

13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que dicho trastorno proliferativo es el cáncer.

14. Utilización según la reivindicación 13, en la que dicho cáncer es el cáncer de próstata.

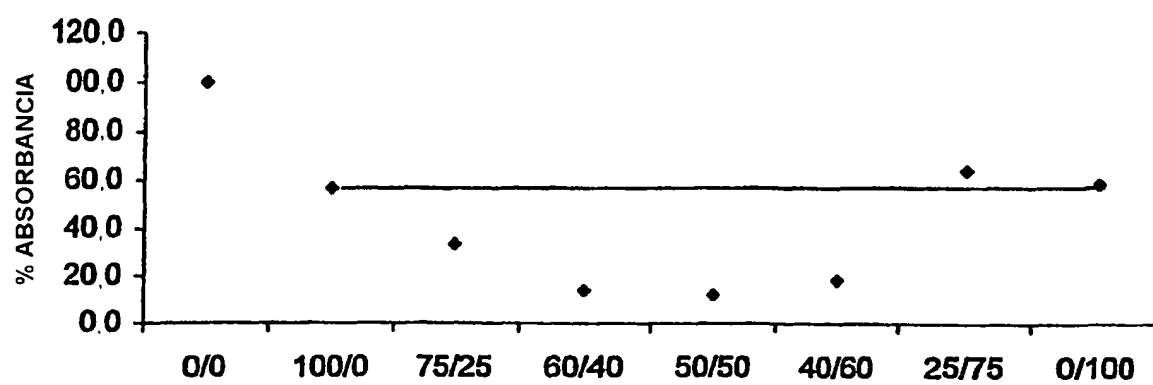


FIGURA 1

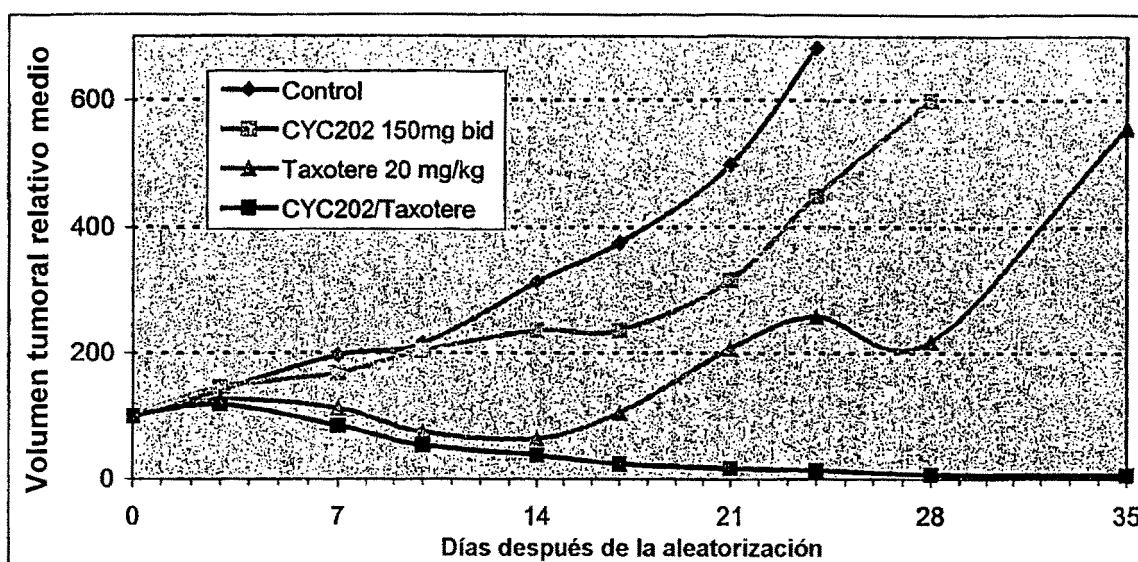


FIGURA 2

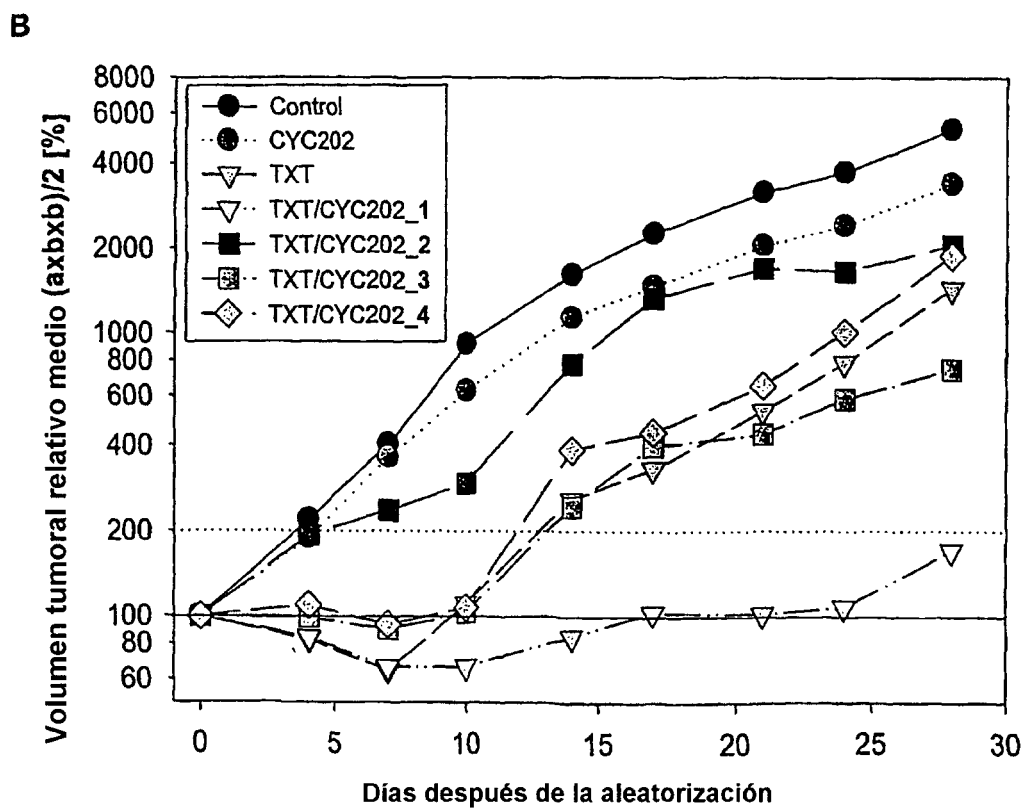
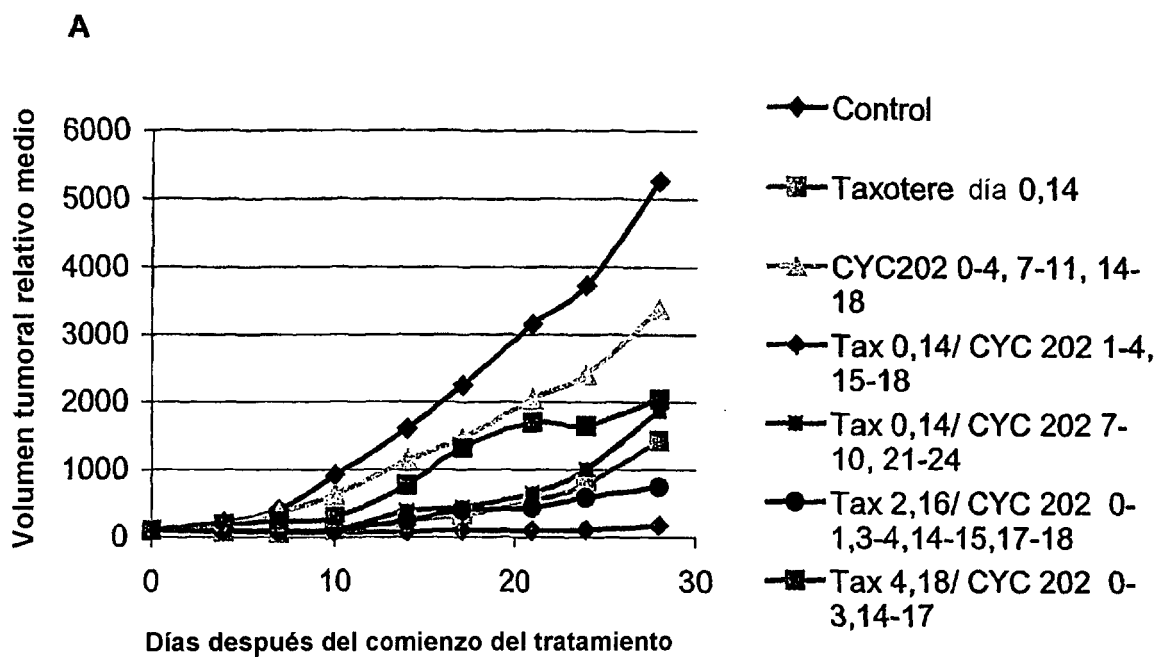


FIGURA 3