



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 323**

51 Int. Cl.:
A61K 31/593 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01916350 .0**
86 Fecha de presentación : **02.03.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1276482**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.2003**

54 Título: **Quimioterapia combinada.**

30 Prioridad: **02.03.2000 US 186506 P**
08.03.2000 US 187806 P
06.04.2000 US 544724

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **University of Pittsburgh of the
Commonwealth System of Higher Education
200 Gardner Steel Conference Center
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US**

72 Inventor/es: **Johnson, Candace, S. y
Trump, Donald, L.**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 300 323 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

Quimioterapia combinada.

5 Combatir el crecimiento de células y tumores neoplásicos ha sido un objetivo importante de investigación biológica y médica. Dicha investigación ha conducido al descubrimiento de agentes citotóxicos nuevos potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Entre algunos ejemplos de agentes citotóxicos utilizados habitualmente en quimioterapia se incluyen agentes antimetabólicos que interfieren con la formación de microtúbulos, agentes alquilantes, agentes basados en platino, antraciclinas, agentes antibióticos, inhibidores de topoisomerasa, y
10 otros agentes.

Además de simplemente identificar agentes quimioterapéuticos eficaces, la investigación del cáncer ha conducido a una mayor comprensión de los mecanismos mediante los cuales estos agentes actúan sobre las células neoplásicas, así como sobre otras células. Por ejemplo, el colecalciferol (vitamina D) puede producir la diferenciación y reducir la proliferación de algunos tipos de células tanto *in vitro* como *in vivo*. El metabolito activo de la vitamina D (1,25-dihidroxicolecalciferol (en adelante "1,25D₃")) y los análogos (por ejemplo, 1,25-dihidroxi-16-en-23-in-colecalciferol (Ro23-7553), 1,25-dihidroxi-16-en-23-in-26,27-hexafluoro-19-nor-colecalciferol (Ro25-6760), etc.) actúan como mediadores de una actividad antitumoral significativa *in vitro* e *in vivo* retrasando el crecimiento de tumores establecidos y evitando la inducción de tumores (Colston y otros, *Lancet*, 1, 188 (1989); Belleli y otros, *Carcinogenesis*, 13, 2293 (1992); McElwain y otros, *Mol. Cell. Diff.*, 3, 31-50 (1995); Clark y otros, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118, 190 (1992); Zhou y otros, *Blood*, 74, 82-93 (1989)). Además de retrasar el crecimiento neoplásico, el 1,25D₃ induce un bloqueo de la fase G₀/G₁-S en el ciclo celular (Godyn y otros, *Cell Proliferation*, 27, 37-46 (1994); Rigby y otros, *J. Immunol.*, 135, 2279-86 (1985); Elstner y otros, *Cancer Res.*, 55, 2822-30 (1995); Wang y otros, *Cancer Res.*, 56, 264-67 (1996)). Estas propiedades han dado como resultado la utilización con éxito del 1,25D₃ para el tratamiento de tumores neoplásicos (véase Cunningham y otros, *Br. J. Cancer*, 63, 4673 (1991); Mackie y otros, *Lancet*, 342, 172 (1993), Bower y otros, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 32, 1257 (1991)).

Además de sus efectos antineoplásicos y bloqueadores del ciclo celular, el tratamiento con 1,25D₃ puede conducir a hipercalcemia. Por consiguiente, el 1,25D₃ se administra típicamente para aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, la enfermedad metabólica del hueso) a dosis relativamente bajas (por ejemplo, desde aproximadamente 1 µg/día hasta aproximadamente 2 µg/día por paciente) a largo plazo. Para mitigar los efectos de la hipercalcemia, se han desarrollado análogos que mantienen la actividad antiproliferativa sin inducir hipercalcemia. (Véase, por ejemplo, Zhou y otros, *Blood*, 73, 75 (1991); Binderup y otros, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1569 (1991); Binderup y otros, pág. 192 en "Actas del 8º Taller sobre la Vitamina D" ("Proceedings of the 8th Workshop on Vitamin D"), París Francia (Norman, A y otros, Editores, Walter de Gruyter, Berlín, (1991))). Muchos de estos análogos sintéticos son más eficaces que el 1,25D₃ en la inhibición del crecimiento neoplásico (para una evaluación de muchos de dichos análogos, véase Calverley y otros, "Vitamina D" ("Vitamin D") en "Esteroides Antitumorales" ("Antitumor Steroids") (Blickenstaff, R. T., Ed., Academic Press, Orlando (1992))).

Los agentes basados en platino se utilizan ampliamente en aplicaciones quimioterapéuticas. Por ejemplo, el cisplatino provoca la muerte de células tumorales a través de la formación de aductos covalentes de ADN inter o intracadena (Sherman y otros *Chem. Rev.*, 87, 1153-81 (1987); Chu, *J. Biol. Chem.*, 269, 787-90 (1994)). De este modo, el tratamiento con dichos agentes basados en platino conduce a la inhibición de la síntesis del ADN (Howle y otros, *Biochem. Pharmacol.*, 19, 2757-62 (1970); Salles y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, 555-63 (1983)). Por lo tanto, las células que sintetizan ADN de forma activa son muy sensibles al cisplatino (Roberts y otros, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 22, 71-133 (1979); Pinto y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)* 82, 4616-19 (1985)). Dichas células experimentan generalmente una parada del crecimiento en G₂ y finalmente sufren apoptosis. Este efecto apoptótico se observa a concentraciones de fármaco insuficientes para inhibir la síntesis del ADN (Sorenson y otros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 749-55 (1990)), sugiriendo que los agentes de platino actúan sobre las células neoplásicas a través de mecanismos múltiples. Algunas células también muestran una sensibilidad al platino aumentada cuando se encuentran en la fase G₁ del ciclo celular (Krishnaswamy y otros, *Mutation Res.*, 293, 161-72 (1993); Donaldson y otros, *Int. J. Cancer*, 57, 847-55 (1994)). Después de la liberación del bloqueo de G₀/G₁-S, dichas células permanecen sensibilizadas al máximo durante el resto del ciclo celular.

Otros agentes quimioterapéuticos actúan mediante mecanismos diferentes. Por ejemplo, los agentes que interfieren con la formación de microtúbulos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, paclitaxel, docetaxel, etc.) actúan contra células neoplásicas interfiriendo con la formación correcta del aparato del huso mitótico (véase, por ejemplo, Manfredi y otros, *Pharmacol. Ther.*, 25, 83-125 (1984)). Por lo tanto, los agentes que interfieren con la formación de microtúbulos actúan principalmente durante la fase mitótica del ciclo celular (Schiff y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 1561-65 (1980); Fuchs y otros, *Cancer Treat. Rep.*, 62, 1219-22 (1978); Lopes y otros, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 32, 235-42 (1993)). Los antimetabolitos actúan sobre diversas vías enzimáticas en células en crecimiento. Por ejemplo, el metotrexato (MTX) es un análogo del ácido fólico que inhibe la dihidrofolato reductasa. Por consiguiente, bloquea la síntesis de timidilato y de purinas necesaria para la síntesis del ADN. Por lo tanto, el principal efecto del MTX tiene lugar en la fase S del ciclo celular, pero también puede tener efecto sobre la síntesis del ARN en G₁ y G₂ (Olsen, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 25, 306-18 (1991)). Por supuesto, también se pueden utilizar otros agentes citotóxicos (por ejemplo, taxanos, tales como taxatyr).

Debido a las diferencias en los mecanismos biológicos de diversos agentes citotóxicos, se han intentado realizar protocolos que incluyen combinaciones de diferentes agentes citotóxicos (por ejemplo, Jekunen y otros, *Br. J. Cancer*, 69, 299-306 (1994); Yeh y otros, *Life Sciences*, 54, 431-35 (1994)). Los protocolos de tratamiento de combinación pretenden incrementar la eficacia de los protocolos citopáticos mediante la utilización de agentes citotóxicos compatibles. A su vez, la posibilidad de que se pueda conseguir suficiente actividad antineoplásica a partir de una combinación determinada de agentes citotóxicos plantea la posibilidad de reducir la dosis de los agentes citotóxicos individuales para minimizar los efectos secundarios perjudiciales. Dado, en parte, a que los diversos agentes citotóxicos actúan durante diferentes fases del ciclo celular, el éxito de los protocolos de combinación depende frecuentemente del orden de aplicación de los fármacos (por ejemplo, Jekunen y otros, cita anterior; Studzinski y otros, *Cancer Res.*, 51, 3451 (1991)).

Han existido intentos de desarrollo de protocolos de fármacos de combinación basados, en parte, en la vitamina D y derivados de la misma. Por ejemplo, se ha estudiado el efecto inhibidor de la administración simultánea de 1,25D₃ y fármacos de platino sobre el crecimiento de células neoplásicas (Saunders y otros, *Gynecol. Oncol.*, 51, 155-59 (1993); Cho y otros, *Cancer Res.*, 51, 2848-53 (1991)), y estudios similares se han centrado en combinaciones simultáneas de 1,25D₃ y otros agentes citotóxicos (Tanaka y otros, *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, 247, 290-96 (1989)). Yu y otros (Proc. Annual Meeting of Am. Ass. Cancer Res., 1998, 39, 157) dan a conocer que el 1,25D₃ aumenta la actividad antitumoral del carboplatino en el carcinoma de células escamosas de ratones y sugieren un tratamiento de combinación basado en el 1,25D₃ más el carboplatino. Sin embargo, los resultados de estos estudios no han sido nada satisfactorios. En particular, no se ha conseguido la secuencia óptima de administración de fármacos. Además, la aplicación de estas tentativas en terapia requeriría la aplicación a largo plazo de dosis elevadas de 1,25D₃ en algunos protocolos, las cuales, tal como se ha mencionado, pueden provocar efectos secundarios significativos. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de un método mejorado para aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, particularmente una necesidad de una terapia de combinación mejorada, que implique especialmente la vitamina D y derivados de la misma.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a quimioterapia de combinación, que implica particularmente vitamina D o un derivado de la misma. En un aspecto, la presente invención permite provocar la muerte de una célula mediante la administración a la célula, en primer lugar, de vitamina D (o un derivado), la administración posterior a la célula de un agente citotóxico y la administración de forma coadyuvante de un bisfosfonato. En los casos en los que se aplica esta estrategia a un tumor intacto, la presente invención permite retrasar el crecimiento del tumor mediante la administración al tumor, en primer lugar, de vitamina D (o un derivado), la administración posterior del agente citotóxico y la administración de forma coadyuvante de un bisfosfonato. Un aspecto adicional de la presente invención permite tratar cáncer de próstata en un paciente mediante la coadministración al paciente de vitamina D (o un derivado) y un glucocorticoide. Todavía en otro aspecto, la presente invención conduce a un método mejorado para el tratamiento de un paciente con vitamina D que implica la administración coadyuvante de zoledronato.

En algunas aplicaciones, la presente invención es útil en terapia, particularmente en el tratamiento de enfermedades neoplásicas o cancerosas. En otras aplicaciones, la presente invención proporciona una herramienta para una nueva investigación que está relacionada con temas que incluyen el crecimiento de células neoplásicas, el control y la regulación del ciclo celular, y el mecanismo y la eficacia de la citotoxicidad y la quimioterapia. En este sentido, el método inventivo es útil para el desarrollo de terapias más refinadas. La presente invención puede entenderse mejor con referencia a la siguiente descripción detallada.

Descripción de las realizaciones preferentes

En una realización, la presente invención permite provocar la muerte de una célula (por ejemplo, una célula diana) mediante la administración a la célula, en primer lugar, de vitamina D (o un derivado), la administración posterior de un agente citotóxico a la célula y la administración de forma coadyuvante de un bisfosfonato. Por supuesto, la presente invención también se refiere a la utilización de vitamina D (o un derivado), el agente citotóxico y un bisfosfonato para preparar medicamentos para el mencionado tratamiento. Se puede utilizar cualquier periodo de pretratamiento; el periodo exacto de pretratamiento variará dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas, dicho pretratamiento puede ser durante tan poco tiempo como aproximadamente un día hasta tanto tiempo como durante 5 días o más; más preferentemente, el periodo de pretratamiento se encuentra entre 2 y 4 días (por ejemplo, aproximadamente 3 días). Después del pretratamiento, el método inventivo implica la administración de un agente citotóxico. Sin embargo, en una realización preferente, se puede administrar de forma coadyuvante un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, etc.), difenhidramina, rantidina, ondasteron antiemético, o ganistron y dichos agentes se pueden administrar con vitamina D (o un derivado). El agente citotóxico se puede administrar solo o bien en combinación con la administración continuada de vitamina D (o un derivado) después del pretratamiento. Aunque típicamente se suspende el tratamiento después de la administración del agente citotóxico, se puede administrar continuamente durante un periodo de tiempo (por ejemplo, periódicamente durante varios días), tal como se desee.

La célula puede ser una sola y aislada de otras células similares (tal como una célula individual en cultivo o una célula neoplásica metastática o diseminada *in vivo*), o la célula puede ser miembro de una colección de células (por ejemplo, dentro de un tumor). Preferentemente, la célula es una célula neoplásica (por ejemplo, un tipo de célula

que muestra proliferación incontrolada, tal como las células cancerosas o transformadas). Las células neoplásicas se pueden aislar (por ejemplo, una célula individual en cultivo o una célula neoplásica metastática o diseminada *in vivo*) o presente en una aglomeración, homogéneamente o bien en una combinación heterogénea con otros tipos de células (neoplásicas o de otro tipo) en un tumor u otra colección de células. En los casos en los que la célula está dentro de un tumor, la presente invención permite retrasar el crecimiento del tumor mediante la administración al tumor, en primer lugar, de vitamina D (o un derivado), la administración posterior al tumor del agente citotóxico y la administración de forma coadyuvante de un bisfosfonato. Debido al efecto citopático de las células individuales, la presente invención puede reducir o eliminar sustancialmente el número de células añadidas a la masa tumoral durante tiempo. Preferentemente, la presente invención consigue una reducción en el número de células dentro de un tumor y, más preferentemente, conduce a la destrucción parcial o completa del tumor (por ejemplo, provocando la muerte de una parte de las células del tumor o sustancialmente todas ellas).

En los casos en los que la célula se asocia con un trastorno neoplásico en un paciente (por ejemplo, un humano), la presente invención permite tratar al paciente mediante la administración, en primer lugar, de vitamina D (o un derivado) al paciente, la administración posterior del agente citotóxico al paciente y la administración de forma coadyuvante de un bisfosfonato. Este planteamiento es eficaz para el tratamiento de mamíferos que sufren un cáncer intacto o diseminado. Por ejemplo, en los casos en los que las células son células diseminadas (por ejemplo, neoplasia metastática), los efectos citopáticos de la presente invención pueden reducir o eliminar sustancialmente las células neoplásicas que es probable que experimenten más proliferación por todo el paciente, reduciendo también así o minimizando la probabilidad de que dichas células proliferen para formar nuevos tumores en el paciente. Además, mediante el retraso del crecimiento de tumores que incluyen células neoplásicas, la presente invención reduce la probabilidad de que las células de dichos tumores finalmente metastaticen o se diseminen. Por supuesto, en los casos en los que la presente invención consigue la reducción real del tamaño del tumor (y especialmente la eliminación del tumor), atenúa los efectos patogénicos de dichos tumores en el paciente. Otra aplicación es en la quimioterapia de dosis alta que requiere trasplante o reconstrucción de médula ósea (por ejemplo, para tratar trastornos leucémicos) para reducir la probabilidad de que las células neoplásicas persistan o recrezcan con éxito.

En muchos casos, el pretratamiento de células o tumores con vitamina D (o un derivado) anteriormente al tratamiento con el agente citotóxico da como resultado un grado de muerte celular aditivo y, a menudo, sinérgico. En este contexto, si el efecto de dos compuestos administrados conjuntamente *in vitro* (a una concentración determinada) es superior a la suma de los efectos de cada compuesto administrado individualmente (a la misma concentración), entonces los dos compuestos se considera que actúan sinérgicamente. Dicha sinergia se consigue a menudo con agentes citotóxicos capaces de actuar contra células en la fase G₀-G₁ del ciclo celular, y dichos agentes citotóxicos se prefieren para la utilización en los métodos inventivos. Aunque se puede utilizar cualquiera de dichos agentes citotóxicos (tal como se ha comentado en la presente invención), los agentes citotóxicos preferentes son los agentes basados en platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, etc.). Sin que ello esté unido a ninguna teoría particular, se cree que la presente invención da como resultado la citotoxicidad de las células neoplásicas mediante la inducción de un bloqueo de la fase G₀/G₁-S del ciclo celular, tal como se ha mencionado en la presente invención. Las células están sensibilizadas a los agentes citotóxicos capaces de actuar sobre células en dicha etapa de bloqueo. Por otra parte, la sincronización de la liberación de las células del bloqueo puede sensibilizarlas colectivamente a los efectos de los agentes que actúen más tarde en el ciclo celular.

Como alternativa a la vitamina D, en el contexto de la presente invención se puede utilizar cualquier derivado de la misma adecuado para la potenciación del efecto citotóxico de los agentes quimioterapéuticos, muchos de los cuales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Calverley y otros, *cita anterior*). Un derivado preferente es su metabolito natural (1,25D₃). Sin embargo, muchos análogos de la vitamina D tienen una actividad antitumoral superior a la del metabolito nativo; de este modo, el derivado de la vitamina D puede ser un análogo de 1,25D₃ de este tipo. Además, en los casos en los que se utiliza la presente invención para aplicaciones terapéuticas, el derivado puede ser un análogo de 1,25D₃ no hipercalcémico, ya que dichos análogos reducen o eliminan sustancialmente los efectos secundarios hipercalcémicos de la terapia basada en vitamina D. Por ejemplo, el análogo puede ser Ro23-7553, Ro24-5531, u otro análogo. En algunas realizaciones, se pueden utilizar como equivalentes de la vitamina D (o un derivado) otros agentes que atenúan (por ejemplo, desactivan) MAP quinasa, induciendo específicamente MAPK fosfatasa.

De acuerdo con la presente invención, la vitamina D (o un derivado) se puede suministrar a las células o tumores de cualquier forma adecuada, la cual dependerá, por supuesto, de la aplicación deseada del método inventivo. De este modo, por ejemplo, para aplicaciones *in vitro*, la vitamina D (o un derivado) se puede añadir al medio de cultivo (por ejemplo, mezclada inicialmente con el medio o añadida después de un tiempo). Para aplicaciones *in vivo*, la vitamina D (o un derivado) se puede mezclar dentro de un vehículo apropiado para la administración a la célula o tumor. De este modo, para la administración sistémica, la vitamina D (o un derivado) se puede suministrar mediante inyección subcutánea, de forma intravenosa, oral o por otros medios adecuados. Por supuesto, la vitamina D (o un derivado) se puede suministrar más directamente al tumor (por ejemplo, mediante la aplicación de una pomada o crema que contiene vitamina D (o un derivado) al tumor, mediante inyección de una solución que contiene vitamina D (o un derivado) dentro del tumor, etc.).

La dosis de vitamina D (o un derivado) suministrada a las células puede variar dependiendo de la aplicación deseada. En investigación, por ejemplo, la dosis puede variar considerablemente, dado que el análisis dosis-respuesta podría ser un parámetro en un estudio determinado. Para aplicaciones terapéuticas, dado que el periodo de pretratamiento puede ser bastante breve en comparación con terapias estándares basadas en vitamina D, se pueden utilizar dosis más

altas que las típicas de vitamina D (o un derivado) (tal como se ha comentado anteriormente) en el método inventivo sin un riesgo sustancial de hipercalcemia. De este modo, por ejemplo, en un paciente humano, se puede suministrar tan poca cantidad como 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ de vitamina D (o un derivado) (la cual, tal como se ha mencionado anteriormente, se encuentra en la dosis normal de 1,25D₃) a un paciente que está sometido a tratamiento, mientras que la cantidad máxima puede ser tan alta como aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ (o incluso más elevada en algunos pacientes más grandes). Preferentemente, se administra al paciente entre 4 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 15 $\mu\text{g}/\text{día}$ (por ejemplo, entre 7 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 12 $\mu\text{g}/\text{día}$) de vitamina D (o un derivado). Típicamente, la cantidad de vitamina D (o un derivado) suministrada no será tan alta como para suponer un riesgo significativo de inducir hipercalcemia o provocar otros efectos secundarios tóxicos. Por lo tanto, en los casos en los que se utilizan derivados de la vitamina D no hipercalcémicos, aún se pueden utilizar cantidades superiores. Por lo tanto, se pueden administrar 30 $\mu\text{g}/\text{día}$ o más (por ejemplo, aproximadamente 40 $\mu\text{g}/\text{día}$ o incluso 50 $\mu\text{g}/\text{día}$ o más) de un derivado de la vitamina D no hipercalcémico a un paciente humano durante el pretratamiento, según el método inventivo. Por supuesto, la dosis deseada de vitamina D (o un derivado) dependerá del tamaño del paciente y del modo y tiempo de administración. La vitamina D (o un derivado) se puede administrar una vez al día, o varias veces al día, tal como se desee, o se puede administrar de forma discontinua (por ejemplo, un día sí y otro no, o cada tres días). La determinación de dichas dosis y programas se encuentra dentro de las prácticas habituales en la técnica.

Se puede utilizar cualquier agente citotóxico en el contexto de la presente invención; tal como se ha mencionado, en la técnica se conocen muchos agentes citotóxicos adecuados para la quimioterapia. Un agente de este tipo puede ser, por ejemplo, cualquier compuesto que media la muerte celular mediante cualquier mecanismo que incluye, aunque no se limita a éstos, la inhibición del metabolismo o de la síntesis del ADN, interferencias con una organización del citoesqueleto, la desestabilización o modificación química del ADN, apoptosis, etc. Por ejemplo, el agente citotóxico puede ser un antimetabolito (por ejemplo, 5-fluorouracil (5-FU), metotrexato (MTX), fludarabina, etc.), un agente antimicrotúbulos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxanos (tales como paclitaxel y docetaxel), etc.), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, melfalan, biscloroetilnitrosourea (BCNU), etc.), agentes de platino (por ejemplo, cisplatino (también denominado cDDP), carboplatino, oxaliplatino, JM-216, CI-973, etc.), antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina, daunorubicina, etc.), agentes antibióticos (por ejemplo, mitomicina C), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, etoposide, camptotecinas, etc.), u otros agentes citotóxicos (por ejemplo, dexametasona). La elección del agente citotóxico depende de la aplicación del método inventivo. Para la investigación, se puede utilizar cualquier agente citotóxico eficaz (incluso un agente citotóxico nuevo) para estudiar el efecto de la toxina sobre células o tumores pretratados con vitamina D (o un derivado). Para aplicaciones terapéuticas, la selección de un agente citotóxico adecuado dependerá, a menudo, de parámetros especiales para cada paciente; sin embargo, la selección de un régimen de citotoxinas para un protocolo quimioterapéutico determinado se encuentra dentro de la práctica de la técnica.

Para la aplicación *in vivo*, la dosis adecuada de un agente citotóxico determinado depende del agente y de su formulación, y la optimización de la dosis y formulación para un paciente determinado se encuentra dentro de las prácticas habituales de la técnica. Por supuesto, la presente invención se refiere a la utilización de dichos agentes para la preparación de medicamentos adecuados para la aplicación *in vivo*. Por lo tanto, por ejemplo, dichos agentes se pueden formular para la administración de forma oral, subcutánea, parenteral, submucosal, intravenosa, u otras vías adecuadas que utilizan métodos estándares de formulación. Por ejemplo, el carboplatino se puede administrar a dosis diarias calculadas para conseguir un (AUC) (“área bajo la curva”) desde 4 hasta 15 (tal como desde 5 hasta 12), o incluso desde 6 hasta 10. Típicamente, el AUC se calcula mediante la fórmula de Calvert, basada en la velocidad de filtración glomerular de la creatinina (por ejemplo, evaluada mediante el análisis de una muestra de plasma) (véase, por ejemplo, Martino y otros, *Anticancer Res.*, 19 (6C), 5587-91 (1999)). El paclitaxel se puede utilizar a concentraciones que oscilan desde 50 mg/m^2 hasta 100 mg/m^2 (por ejemplo, aproximadamente 80 mg/m^2). En los casos en los que se utiliza dexametasona, se puede utilizar en pacientes a dosis que oscilan entre 1 mg y 10 mg (por ejemplo, desde 2 mg hasta 8 mg), y más particularmente desde 4 mg hasta 6 mg, particularmente en los casos en los que el paciente es humano.

Otra realización de la presente invención permite tratar el cáncer de próstata en un paciente mediante la administración al paciente de forma coadyuvante de vitamina D (o un derivado) y un glucocorticoide. La presente invención también se refiere a la utilización de dichos agentes para preparar medicamentos adecuados para dicho régimen de tratamiento. Según este aspecto de la presente invención, se puede utilizar cualquier derivado de la vitamina D y glucocorticoide, muchos de los cuales se comentan en alguna parte de la presente invención y otros se conocen generalmente en la técnica. Además, la vitamina D (o un derivado) y el glucocorticoide se administran al paciente mediante cualquier método adecuado, algunos de los cuales se han expuesto en la presente invención. Por lo tanto, se pueden formular dentro de preparaciones adecuadas y administrar de forma subcutánea, intravenosa, oral, etc., según corresponda. Además, por ejemplo, el glucocorticoide se administra al paciente de forma simultánea, anterior a la administración de vitamina D (o un derivado) o posterior a la misma. Un programa de dosis eficaz se sitúa entre 8 μg y 12 μg de vitamina D (o un derivado) diariamente o en días alternos (por ejemplo, entre 2 y 4 días a la semana, tal como lunes-miércoles-viernes o martes-jueves-sábado, etc.), y también entre 1 mg y 10 mg de dexametasona (por ejemplo, aproximadamente 5 mg) a un paciente humano también en días alternos. En un régimen de este tipo, los días alternos en los que se administra la vitamina D (o un derivado) y en los que se administra el glucocorticoide pueden ser diferentes, aunque preferentemente se administran los mismos días. Incluso más preferentemente, el glucocorticoide se administra una vez, por sí mismo, anteriormente al tratamiento simultáneo. Por supuesto, el tratamiento puede continuar durante cualquier intervalo de tiempo deseable, y se puede repetir, según corresponda, para conseguir los resultados finales deseados. Dichos resultados pueden incluir la atenuación de la progresión del cáncer de próstata, el

encogimiento de dichos tumores o, de forma deseable, la remisión de todos los síntomas. Sin embargo, cualquier grado de efecto se considera una aplicación con éxito de este método. Un método conveniente para evaluar la eficacia del método es anotar el cambio en la concentración del antígeno específico de próstata (PSA) en el paciente. Típicamente, dicha respuesta se evalúa mediante la medición de los niveles de PSA en un periodo de tiempo de aproximadamente 6
 5 semanas. De forma deseable, el método da como resultado, como mínimo, una disminución de los niveles de PSA de aproximadamente el 50%, después de 6 semanas de aplicación, y más deseablemente, una reducción de PSA, como mínimo de aproximadamente el 80%. Por supuesto, el resultado más deseable es la disminución de los niveles de PSA hasta niveles aproximadamente normales (por ejemplo, inferiores a 4 ng/ml aproximadamente para, como mínimo, tres medidas consecutivas en un individuo no prostatectomizado o inferiores a 0,2 ng/ml aproximadamente en un individuo
 10 prostatectomizado).

En todos aspectos de la presente invención que implican la aplicación *in vivo*, preferentemente se minimizan las propiedades hipercalcémicas de la vitamina D. Una forma de conseguir este efecto es la utilización de un análogo no hipercalcémico de la vitamina D, tal como los comentados anteriormente. De forma alternativa, o junto con
 15 la utilización de dichos análogos, se puede administrar al paciente de forma coadyuvante un agente que atenúe la hipercalcemia. Aunque se puede utilizar cualquiera de estos agentes, los bisfosfonatos (por ejemplo, alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato, zoledronato, etc.) son los agentes preferentes para la administración coadyuvante. Dichos agentes se pueden administrar de cualquier forma adecuada para atenuar la hipercalcemia. De este modo, se pueden formular dentro de preparaciones adecuadas y administrar de forma subcutánea, intravenosa, oral, etc., según corresponda. Además, dichos agentes se pueden administrar de forma simultánea,
 20 anterior a la vitamina D (o un derivado) o posterior a la misma. La dosis de dichos agentes, por supuesto, variará con la eficacia de los compuestos y también atenuará cualquier efecto secundario no deseado. De este modo, por ejemplo, para la administración a pacientes humanos, la dosis de bisfosfonatos puede variar entre 1 mg/día y 500 mg/día (por ejemplo, entre 5 mg/día y 100 mg/día), tal como entre 10 mg/día y 50 mg/día, o incluso entre 30 mg/día y 40 mg día, dependiendo de la eficacia de los bisfosfonatos. En general, se prefiere utilizar un bisfosfonato más eficaz, dado que se necesita utilizar menor cantidad de agente para conseguir los efectos antihypercalcémicos. Por lo tanto, un bisfosfonato más preferente es el zoledronato, dado que es eficaz incluso a dosis muy bajas (por ejemplo, entre 0,5 mg día y 2 mg/día en pacientes humanos, o entre 5 µg/kg y 25 µg/kg de peso corporal).

De hecho, en otro aspecto, la presente invención da a conocer un método mejorado de utilización de la vitamina D (o un derivado) terapéuticamente mediante la administración de forma coadyuvante del zoledronato. Es decir, la presente invención se refiere a la utilización de vitamina D (o un derivado de la misma) y zoledronato en medicina,
 en la que la vitamina D o un derivado de la misma y el zoledronato se administran de forma coadyuvante a un paciente. El zoledronato se puede administrar como un coadyuvante junto con cualquier protocolo en el cual se utiliza
 35 vitamina D (o un derivado), tal como los comentados en la presente invención o los utilizados de otra manera. Como coadyuvante, el zoledronato se puede administrar en cualquier régimen deseado (varias veces al día, diariamente, semanalmente, etc.), tal como se desee. Preferentemente, el zoledronato se administra como un pretratamiento, por ejemplo, de varias horas a varios días anteriormente a que comience el tratamiento con vitamina D (o un derivado). Más preferentemente, el zoledronato se administra de forma coadyuvante en una cantidad suficiente para atenuar los
 40 efectos antihypercalcémicos de la vitamina D (o un derivado).

Ejemplos

Ejemplo 1

45 Este ejemplo explica los materiales y métodos generales utilizados en los siguientes ejemplos.

Se obtuvieron hembras consanguíneas de ratones C3H/HeJ de 6-10 semanas de edad de Jackson Laboratories. Los ratones estaban libres de anticuerpos de virus, tenían edades y pesos que se correspondían con la utilización
 50 experimental y se alimentaron con una dieta de roedor equilibrada.

Se mantuvieron células SCCVII/SF *in vivo* - una línea tumoral escamosa murina, de rápido crecimiento, no metastatizante -en ratones C3H/HeJ, tal como se han descrito anteriormente (McElwain y otros, *Mol. Cell. Diff.* 3, 31- 50 (1995)) mediante inoculación s.c. de 5×10^5 células en cultivo de tejido en fase log en el costado derecho del animal. La línea celular SCCVII/SF se mantuvo *in vitro* en RPMI-1640 complementada con un 12,5% de suero fetal de ternero
 55 inactivado (FCS) y un 1% de sulfato de penicilina-estreptomina.

El 1,25D₃ y su análogo no hipercalcémico Ro23-7553 se almacenaron inicialmente en forma de polvo puro en un recipiente sellado, protegido frente a la luz, a 4°C. Para su utilización, cada fármaco se reconstituyó en alcohol etílico
 60 al 100% y se mantuvo tal como se ha descrito (McElwain y otros, *Mol. Cell. Diff.*, 3, 31-50 (1995)). Los agentes citotóxicos (carboplatino, cisplatino, y paclitaxel) se diluyeron en solución salina al 0,9% y se inyectaron i.p. a varias dosis en un volumen total de 0,2 ml durante los protocolos experimentales.

Se determinó la citotoxicidad del fármaco *in vitro* sobre las células tumorales a través del ensayo clonogénico *in vitro* (McElwain y otros, *Mol. Cell. Diff.*, 3, 31-50 (1995)) con modificaciones menores, tal como se ha descrito en la presente invención. Brevemente, se pretrataron células murinas SCCVII/SF con 1,25D₃ o Ro23-7553 2 nM o bien 4 nM. Aunque el 1,25D₃ o Ro23-7553 no fueron estables durante largos periodos en medios de cultivo de tejido, se observaron los efectos antiproliferativos a tiempos de incubación de 24 horas, 48 horas y 7 días (McElwain y otros,
 65

ES 2 300 323 T3

cita anterior). Después de la incubación durante 48 horas con 1,25D₃ o Ro23-7553, las células se trataron durante 2 horas con concentraciones diferentes de agente citotóxico, se lavaron con RPMI 1640 más FCS, y se colocaron, en diferentes diluciones, en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos. Después de una incubación de 7 días a 37°C en CO₂ al 5%, se lavaron las monocapas con solución salina, se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con Giemsa al 10%. Las colonias se contaron bajo microscopio óptico. Se calculó la fracción superviviente dividiendo la eficacia de clonaje de las células tratadas por la eficacia de clonaje de los controles no tratados.

El efecto del 1,25D₃ o Ro23-7553 solo y/o en combinación con diversos agentes citotóxicos sobre las células tumorales *in vivo* se determinó mediante una modificación del ensayo clonogénico de supervivencia *in vivo* de células tumorales por extirpación (Johnson y otros, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 32, 339-46 (1993)). Brevemente, se trataron i.p. animales portadores de tumores SCCVII/SF a los 14 días después de la implantación, durante 3 días, con dosis de 1,25D₃ o Ro23-7553 por 0,5 mg/kg de peso corporal/día o bien con dosis diferentes de 0,03125-0,5 mg/kg de peso corporal/día. El día 3, los animales también recibieron una dosis del agente citotóxico i.p. de 6 mg/kg de peso corporal o bien dosis diferentes de 1-6 mg/kg de peso corporal. Después de 24 horas, se disociaron enzimáticamente alícuotas de tumor triturado durante 60 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de colagenasa de tipo I (37,5 mg/ml), ADNasa (55 mg/ml) y EDTA (1%). A continuación, se colocaron en placas células tumorales viables a varias diluciones (determinadas mediante tinción con azul de tripano). Después de 7 días de incubación, se contaron las colonias, y se contaron los números de células clonogénicas por gramo de tumor. El rendimiento de células, la eficacia de clonaje, y el número de células clonogénicas de tumores de control (sin tratamiento) (n=40) con media \pm desviación estándar (SD) tuvieron un promedio de $139,4 \pm 38,2 \times 10^6$ células tumorales viables/g de tumor, $27,0 \pm 0,56\%$ y $37,5 \pm 13,3 \times 10^6$ células tumorales clonogénicas/g de tumor, respectivamente. La fracción superviviente por gramo de tumor se define como el número de células tumorales clonogénicas por gramo de tumor tratado dividido por el número de células tumorales clonogénicas por gramo de tumor de control (no tratado). Este ensayo es una medida exacta de la actividad antitumoral *in vivo*; una fracción superviviente inferior a 0,1 se correlaciona con una disminución real en el volumen del tumor y un incremento en el retraso del recrecimiento del tumor (Braunschweiger y otros, *Cancer Res.*, 48, 6011-16 (1988); Braunschweiger y otros, *Cancer Res.*, 51, 5454-60 (1991)).

El efecto del 1,25D₃ o Ro23-7553 solo y/o en combinación con varios agentes citotóxicos sobre células tumorales *in vivo* se ensayó nuevamente midiendo el retraso del crecimiento del tumor (ensayo de recrecimiento tumoral). Se inocularon s.c. células tumorales SCCVII/SF (5×10^5) en el costado de la pata de ratones C3H/HeJ. El día 9 después de la implantación, dado que los tumores eran palpables (aproximadamente 5x5 mm), se escogieron los animales al azar para su tratamiento i.p. con una dosis baja de Ro23-7553 (0,214 μ g/kg de peso corporal/día) o 1,25D₃ (0,2 μ g/ratón) utilizando una bomba microosmótica para la administración continua durante más de siete días. Después de 7 días, se inyectaron i.p. 6 mg/kg de peso corporal de agente citotóxico. Los animales de control recibieron tratamiento simple o bien ningún tratamiento. A los animales de control (sin tratamiento) se les dieron inyecciones sólo de vehículo (PBS) o se les implantaron bombas simuladas. El crecimiento del tumor se calculó midiendo el diámetro del tumor con calibreadores tres veces semanalmente. Los volúmenes de los tumores se calcularon mediante la fórmula: volumen = longitud x (anchura²)/2). Los volúmenes de postratamiento se expresaron como una fracción del volumen de pretratamiento en el momento del tratamiento inicial. El retraso del recrecimiento del tumor se calculó como la media \pm desviación estándar de la diferencia de tiempo, para volúmenes de tumor tratados y de control, en alcanzar 4 veces el volumen de pretratamiento.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la capacidad para la sensibilización de células tumorales a los efectos de la terapia con cisplatino citotóxico convencional mediante pretratamiento con un derivado de la vitamina D.

Se ensayaron entre 0,2 μ g/ml y 0,8 μ g/ml de cisplatino y Ro23-7553 solos o en combinación mediante el ensayo clonogénico *in vitro* para la línea celular tumoral SCCVII/SF, tal como se ha descrito anteriormente. Se observó que el pretratamiento de las células con Ro23-7553 tanto 2 nM como 4 nM aumentaba significativamente la muerte de células clonogénicas en comparación con el cisplatino solo o en administración simultánea (es decir, sin pretratamiento) del cisplatino en combinación con Ro23-7553 ($p < 0,001$ ANOVA). El aumento significativo de la citotoxicidad mediada por cisplatino se observó incluso a dosis bajas de cisplatino.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el aumento de la actividad antitumoral mediada por el cisplatino *in vivo* mediante el pretratamiento con un derivado de la vitamina D.

Se utilizó el ensayo de muerte clonogénico por extirpación, en el que se trataron i.p. animales portadores de tumores SCCVII/SF a los 14 días después de la implantación, durante 3 días con 0,5 mg/kg de peso corporal/día de Ro23-7553. El tercer día los animales recibieron dosis diferentes de cisplatino. Después de 24 horas, los tumores se recolectaron, se disociaron y se colocaron en placa para una incubación de 7 días. Se observó que el pretratamiento durante 3 días con el Ro23-7553 antes que el cisplatino daba como resultado un aumento significativo de la muerte de células clonogénicas comparado con animales tratados con cisplatino o Ro23-7553 solos ($p < 0,001$ ANOVA). Se observó un aumento significativo en la muerte de células tumorales clonogénicas en cada dosis de cisplatino ensayada, comparado con el cisplatino solo.

ES 2 300 323 T3

Para determinar el efecto de la variación de la dosis de Ro23-7553 en este ensayo, se trataron ratones portadores de tumores SCC diariamente durante 3 días con desde 0,03125 mg/kg de peso corporal/día hasta 0,5 mg/kg de peso corporal/día de Ro23-7553. El día 3 se administró cisplatino en proporción de 6 mg/kg de peso corporal. Se observó que el Ro23-7553 era capaz de aumentar significativamente la muerte de células tumorales mediada por cisplatino, incluso a las dosis más bajas ensayadas, comparado con el cisplatino o Ro23-7553 solos ($p < 0,01$ ANOVA). Ningún animal en cualquier tentativa experimental se volvió hipercalcémico a ninguna de las dosis de Ro23-7553.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra el aumento de la actividad antitumoral mediada por cisplatino *in vivo* mediante el pretratamiento con un derivado de la vitamina D.

Se utilizó el ensayo de recrecimiento tumoral en el que se trataron ratones portadores de tumores SCCVII/SF (día 9 después de la implantación) con Ro23-7553 administrado continuamente. Al final de la administración de Ro23-7553 se inyectó i.p. cisplatino en proporción de 6 mg/kg de peso corporal. A los animales de control (sin tratamiento) o con tratamiento simple se les inyectó el vehículo (PBS) o se les implantaron bombas simuladas dependiendo del grupo de tratamiento. Todos los animales experimentaron una disminución significativa del volumen tumoral fraccional cuando se pretrataron con Ro23-7553 anteriormente al cisplatino, en comparación con el tratamiento con cada agente solo ($p < 0,001$ ANOVA). Cuando se examinó el retraso en el recrecimiento tumoral (media \pm SD de la diferencia en el tiempo, para tumores tratados y de control, en alcanzar 4 veces el tamaño de pretratamiento), se observó un incremento significativo en animales tratados con Ro23-7553 más cisplatino, en comparación con cisplatino o bien con Ro23-7553 solos (véase Tabla 1).

TABLA 1

Efecto de Ro23-7553 y Cisplatino sobre el Retraso en el Recrecimiento Tumoral	
Tratamiento	Retraso en el Recrecimiento Tumoral
Ro23-7553	1,8 \pm 0,8
Cisplatino	4,4 \pm 0,3
Ro23-7553/cisplatino	7,7 \pm 0,4

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la capacidad para sensibilizar células tumorales a los efectos de la terapia del cisplatino mediante el pretratamiento con un derivado de la vitamina D y dexametasona.

Se incubaron células SCC con dexametasona, 1,25D₃, y/o cisplatino, y se determinó la viabilidad de las células a través de la exclusión con azul de tripano. Se observó que el pretratamiento con dexametasona y 1,25D₃ seguido de cisplatino dio como resultado una inhibición del crecimiento superior a la del tratamiento con cualquier agente solo o al pretratamiento con 1,25D₃ seguido de cisplatino. Estos resultados demuestran que el pretratamiento con un derivado de la vitamina D y dexametasona aumenta el efecto antitumoral del cisplatino.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra la capacidad para sensibilizar células tumorales a los efectos de la terapia con cisplatino mediante el pretratamiento con un derivado de la vitamina D y dexametasona *in vivo*.

Se trataron ratones portadores de tumores SC con dexametasona los días 0-3, con 1,25D₃ los días 1-3, y/o con cisplatino el día 3. Se observó una actividad antiproliferativa mayor en los animales tratados triplemente respecto a los animales tratados con dexametasona seguida de cisplatino ($p < 0,003$ utilizando el ensayo de Mann-Whitely) o con 1,25D₃ seguido de cisplatino ($p < 0,05$ utilizando el ensayo de Mann-Whitely). Estos resultados demuestran que el pretratamiento con un derivado de la vitamina D y dexametasona aumenta el efecto antitumoral del cisplatino.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que los derivados de la vitamina D pueden regular a la alza una MAPK fosfatasa.

Se trataron células SCC *in vitro* con 1,25D₃ 10 nM, y las células no tratadas sirvieron de control. Se calculó el nivel de MAPK fosforilada a las 24 y 48 horas después del tratamiento. También se calcularon las cantidades de MAPK,

ES 2 300 323 T3

MEK (la quinasa responsable de la fosforilación de MAPK), MKP-1 (una fosfatasa específica de MAPK), y receptores de los factores de crecimiento (receptores de los factores de crecimiento EGF, PDGF, e IGF1) utilizando análisis de Transferencia Western. Además, se calculó el nivel de actividad de la MEK mediante ensayos quinasa cuantitativos *in vitro*.

5

Las células tratadas con 1,25D₃ presentaron menos MAPK fosforilada que las células no tratadas, pero la cantidad de proteína MAPK no se vio afectada. Las células tratadas tenían presente una cantidad ligeramente menor de proteína MEK, pero el perfil de actividad de MEK no fue significativamente diferente al de las células no tratadas. Además, las células tratadas presentaban cantidades significativamente superiores de receptores de los factores del crecimiento EGF, PDGF, e IGF1 con respecto a las células no tratadas, así como cantidades superiores de MKP-1.

10

Los resultados indican que el 1,25D₃ no inhibe MAPK mediante la inhibición de la señal mitogénica de más arriba de los receptores del factor del crecimiento, pero que puede inhibir esta proteína mediante la regulación a la alza de la N4KP-1.

15

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la capacidad de sensibilizar células tumorales a los efectos de la terapia con carboplatino citotóxico convencional mediante el pretratamiento con un derivado de la vitamina D.

20

Se ensayaron el carboplatino y el 1,25D₃ solos y en combinación utilizando el ensayo clonogénico *in vitro*. Se observó que el pretratamiento de las células con 1,25D₃ 2 nM durante 48 horas aumentó significativamente la muerte de células clonogénicas en comparación con el carboplatino solo o con administración simultánea (es decir, sin pretratamiento) del carboplatino en combinación con 1,25D₃ (p<0,001 ANOVA).

25

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra el aumento de la actividad antitumoral mediada por carboplatino *in vivo* mediante el pretratamiento con un derivado de la vitamina D.

30

Se utilizó el ensayo de muerte clonogénica por extirpación en el que se trataron i.p. animales portadores de tumores SCCVII/SF a los 14 días después de la implantación, durante 3 días, con 0,5 mg/kg de peso corporal/día de 1,25D₃. El tercer día los animales recibieron dosis diferentes de carboplatino (entre 25 mg/kg de peso corporal y 100 mg/kg de peso corporal). Después de 24 horas, los tumores se recolectaron, disociaron y se colocaron en placas para una incubación de 7 días. Se observó que el pretratamiento durante 3 días con 1,25D₃ anteriormente al carboplatino dio como resultado un aumento significativo de la muerte de células clonogénicas comparado con animales tratados con carboplatino o 1,25D₃ solos (p<0,001 ANOVA). Se observó un aumento significativo de la muerte de células tumorales clonogénicas en cada dosis de carboplatino ensayada.

35

En un segundo experimento, se utilizó el ensayo de muerte clonogénico por extirpación en el que se trataron i.p. animales portadores de tumores SCCVII/SF a los 14 días después de la implantación, durante 3 días, con 1,25D₃ a diferentes dosis. El tercer día, los animales recibieron 50 mg/kg de peso corporal/día de carboplatino. Después de 24 horas, los tumores se recolectaron, disociaron y se colocaron en placas para una incubación de 7 días. Se observó que el pretratamiento con 1,25D₃ anteriormente al carboplatino dio como resultado un aumento significativo de las células clonogénicas, incluso a las dosis más bajas de 1,25D₃. Se observó un incremento significativo de la muerte de células tumorales clonogénicas a cada dosis de carboplatino ensayada, comparado con el carboplatino solo (p<0,001 ANOVA). Ningún animal se volvió hipercalcémico a cualquiera de las dosis de 1,25D₃ ensayadas.

40

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra la capacidad para sensibilizar células tumorales a los efectos del paclitaxel citotóxico convencional mediante el pretratamiento con un análogo de la vitamina D.

50

Se ensayaron paclitaxel y 1,25D₃ solos y en combinación mediante el ensayo clonogénico *in vitro*, tal como se ha descrito anteriormente. Se observó que el pretratamiento de células con 1,25D₃ aumentó significativamente la muerte de células clonogénicas en comparación con el 1,25D₃ (p<0,001 ANOVA). También se observó que la administración simultánea de 1,25D₃ y paclitaxel no dio como resultado un aumento de la muerte de células clonogénicas por encima del paclitaxel solo.

55

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra el aumento de la actividad antitumoral *in vivo* mediada por paclitaxel mediante el pretratamiento con 1,25D₃.

60

Se utilizó el ensayo de muerte clonogénico por extirpación en el que se trataron i.p. animales portadores de tumores SCCVII/SF a los 11 días después de la implantación durante 3 días con 0,2 µg/día de 1,25D₃. El tercer día, los animales recibieron dosis diferentes de paclitaxel. Después de 24 horas, los tumores se recolectaron, se disociaron y se colocaron en placas para una incubación de 7 días. Se observó que el pretratamiento durante 3 días con 1,25D₃ anteriormente

65

ES 2 300 323 T3

al paclitaxel, a todas las dosis, dio como resultado un aumento significativo de la muerte de células clonogénicas comparado con animales tratados con paclitaxel solo ($p < 0,001$ ANOVA). También se observó un aumento significativo en la muerte de células tumorales clonogénicas a cada dosis de paclitaxel ensayada en comparación con el paclitaxel solo. Ningún animal se volvió hipercalcémico durante estos tratamientos.

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra el aumento de la actividad antitumoral mediada por paclitaxel *in vivo* mediante el pretratamiento con 1,25D₃.

Se utilizó el ensayo de recrecimiento tumoral en el que se trataron ratones portadores de tumores SCCVII/SF (7 días después de la implantación) con 0,2 μg /ratón de 1,25D₃ administrado continuamente entre dos y ocho días. Al final de la administración de 1,25D₃, se inyectó i.p. paclitaxel en proporción de 40 mg/kg de peso corporal. A los animales de control (sin tratamiento) o con tratamiento simple se les inyectó vehículo (PBS) o se les implantaron bombas simuladas, en función del grupo de tratamiento. Todos los animales experimentaron una disminución significativa del volumen del tumor fraccional cuando se pretrataron con 1,25D₃ previamente al paclitaxel, comparado con el tratamiento con cada agente solo ($p < 0,001$ ANOVA).

Ejemplo 13

Este es un ejemplo de un programa de dosis clínicas para el tratamiento con carboplatino y 1,25D₃, según la presente invención.

Se sometieron pacientes con tumores malignos a un régimen de tratamiento que implicaba carboplatino y 1,25D₃, pero 48 horas anteriormente al tratamiento, cada paciente se sometió a una dieta baja en calcio (250-300 mg/48 horas) y se mantuvo con esa dieta durante, como mínimo, 7 días. El programa de tratamiento para los pacientes es tal como se indica en la Tabla 2.

TABLA 2

Ciclo	Dosis de 1,25D ₃	Dosis de carboplatino
1	4 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
2	6 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
3	8 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
4	11 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
5	14 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
6	18 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
7	23 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
8	30 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1
9	39 μg , SQ, QD 1-3	AUC 5X1

Según ese régimen, cada ciclo dura cuatro semanas. En ciclos sucesivos, la dosis de 1,25D₃ se incrementa en un 30%. En los primeros dos ciclos, los pacientes se dividieron en dos grupos, tal como sigue:

Grupo 1. El día 1, a este grupo de pacientes se le dio carboplatino (de forma intravenosa como infusión de 30 minutos en 100 ml de transportador) a una dosis calculada para conseguir un AUC=5. Se tomó una muestra de sangre, 24 horas más tarde, para determinar el AUC del carboplatino y los pacientes se sometieron a un régimen de tres días de 1,25D₃ subcutáneo, según el programa indicado en la Tabla 2.

Grupo 2. El día 1, este grupo de pacientes se sometió a un régimen de tres días de 1,25D₃ subcutáneo. El día 3, a los pacientes se les dio carboplatino a una dosis calculada para conseguir un AUC=5. Se tomó una muestra de sangre, 24 horas más tarde, para determinar el AUC del carboplatino.

Después del primer ciclo, se hizo un cambio en los grupos entre pretratamiento y postratamiento. Para el tercer ciclo y los posteriores de este tratamiento, los pacientes se sometieron a un régimen de tres días de 1,25D₃ subcutáneo. El día 3, a los pacientes se les dio carboplatino a una dosis calculada para conseguir un AUC=5. Se tomó una muestra de sangre, 24 horas más tarde, para determinar el AUC del carboplatino.

ES 2 300 323 T3

Después de los primeros dos ciclos, se examinaron los pacientes para determinar el efecto sobre el AUC del carboplatino mediante pretratamiento frente post tratamiento con 1,25D₃. El AUC del carboplatino fue más grande en cada paciente cuando se había pretratado con 1,25D₃ respecto a cuando se le había dado carboplatino en primer lugar (media de AUC = 7,8 µg/ml·h ± 1,3, carboplatino D1; 6,7 µg/ml·h ± 1,3, carboplatino D3). De forma coherente con el cambio en el AUC, la mielosupresión fue consecuentemente menor en cada paciente cuando al carboplatino le siguió 1,25D₃ coadyuvante.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra un método de tratamiento del cáncer de próstata en un paciente mediante la administración de forma coadyuvante de un derivado de la vitamina D y dexametasona al paciente.

Se seleccionaron treinta y dos pacientes con cáncer de próstata independiente de andrógenos en base a la progresión del cáncer, a pesar de la terapia de supresión antiandrogénica. Se midió la concentración del antígeno específico de próstata (PSA) en el suero de cada uno, y se trataron con 1,25D₃ y dexametasona en un régimen indicado en la Tabla 3.

TABLA 3

Ciclo	Dosis de 1,25D ₃	Dosis de dexametasona
1 (28 días)	8 µg L-X-V cada semana	4 mg Dom (primera semana) 4 mg L-X-V cada semana
2 (28 días)	10 µg L-X-V cada semana	4 mg L-X-V cada semana
3 (28 días)	12 µg L-X-V cada semana	4 mg L-X-V cada semana

Se examinó si los pacientes completaron este régimen, y de los 36 pacientes iniciales, se examinaron 24 en base al cambio en los niveles de PSA del suero. Cinco de los pacientes mostraron, como mínimo, el 50% de reducción de los niveles de PSA después de este tratamiento, mientras que en los 19 restantes la velocidad de progresión de la enfermedad se atenuó marcadamente. No se observó toxicidad en ninguno de estos pacientes. Estos resultados indican que la coadministración de una vitamina D (o un derivado) y dexametasona puede tratar con éxito el cáncer de próstata.

Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra que la administración coadyuvante de zoledronato disminuye significativamente la hipercalemia mediada por los derivados de la vitamina D.

Se pretrataron ratones C3H/HeJ normales con zoledronato en proporción de 10 µg/kg de peso corporal y, a continuación, se trataron con 0,25 µg de 1,25D₃ una vez al día durante tres días. Los animales de control recibieron 1,25D₃ solo, y un grupo de animales recibieron solo zoledronato. Después del último tratamiento con 1,25D₃, se extrajo sangre a las 0, 24 y 48 horas de cada ratón, y se midieron los niveles de calcio en el suero.

Los niveles iniciales de calcio se redujeron significativamente en los animales experimentales, comparado con los animales de control (p= 0,00002). En los animales de control los niveles de calcio en el suero permanecieron altos 24 y 48 horas después (17,2 ± 1,1 mg/dl y 16,5 ± 1,1 mg/dl, respectivamente), mientras que los niveles de calcio en el suero de los animales experimentales permaneció reducido (14,7 ± 0,9 mg/dl y 13,4 ± 0,9 mg/dl, respectivamente). Además, los animales experimentales, así como los tratados con zoledronato solo, mostraron menos deshidratación, piloerección y caquexia atribuible a la hipercalemia que los animales de control. Estos resultados demuestran que el zoledronato disminuye significativamente la hipercalemia mediada por vitamina D (o un derivado).

Ejemplo 16

Este es un ejemplo de programa de dosis clínica para el tratamiento con paclitaxel y 1,25D₃, según la presente invención.

Se sometieron pacientes con tumores malignos a un régimen de tratamiento que implicaba paclitaxel y 1,25D₃. El paclitaxel se administró como un concentrado de solución estéril (6 mg/ml) en aceite de ricino polietoxilado al 50% y

ES 2 300 323 T3

5 etanol USP deshidratado al 50%. Inmediatamente antes de la utilización, este concentrado se diluyó para conseguir la dosis adecuada en volúmenes de inyección de NaCl al 0,9%, USP o bien de inyección de dextrosa al 5%, USP (DW5). La preparación se llevó a cabo en cristal para evitar la lixiviación del plastificante de dietilhexilftalato. El 1,25D₃ se administró como pastillas de 0,5 µg de Hoffinan-LaRoche Pharmaceutical Corporation. El programa de tratamiento para los pacientes fue tal como se indica en la Tabla 4.

TABLA 4

Ciclo	Dosis de 1,25D ₃ ,	Dosis de paclitaxel
1	4 µg oralmente	80 mg/m ² IV
2	6 µg oralmente	80 mg/m ² IV
3	8 µg oralmente	80 mg/m ² IV
4	10 µg oralmente	80 mg/m ² IV
5	13 µg oralmente	80 mg/m ² IV

Según este régimen, cada ciclo duró ocho semanas. Para ciclos sucesivos, la dosis de 1,25D₃ se incrementó en un 30%. Dentro de cada ciclo, se administró 1,25D₃ una vez al día (entre 8 de la mañana y 12 del mediodía) durante los primeros tres días. El tercer día, se administraron intravenosamente 20 mg de dexametasona, 50 mg de difenhidramina, 50 de rantidina, y ondasteron antiemético (10 mg) o ganisteron (1 mg), 90 minutos después de la administración de 1,25D₃. Dos horas después de la administración de 1,25D₃, se administró el paclitaxel intravenosamente en 250 ml de solución salina neutra durante más de una hora. Después de cuatro días de descanso (días 4-7), se repitió la rutina de tratamiento de tres días, descanso de cuatro días hasta el último día de administración de paclitaxel (día 45). Los pacientes descansaron entonces el resto del ciclo (días 46-63), después de lo cual el siguiente ciclo empezó.

Incorporación por referencia

Todas las fuentes (por ejemplo, solicitudes de patente, patentes, publicaciones impresas, y similares) a las cuales se ha hecho referencia o se han citado en cualquier parte del presente documento se incorporan en la presente invención y forman parte de la presente descripción mediante tales referencias a ellas.

Guía para la interpretación

La precedente es una descripción integrada de la presente invención como totalidad, no simplemente de cualquier elemento particular de un aspecto de la misma. La descripción describe “realizaciones preferentes” de la presente invención, que incluyen el mejor modo que los inventores conocen para llevarlas a cabo. Por supuesto, tras la lectura de la descripción precedente, parecerán obvias variaciones de aquellas realizaciones preferentes para los especialistas en la técnica. Los presentes inventores esperan que los técnicos especializados utilicen dichas variaciones según corresponda, y los presentes inventores pretenden que la invención se practique de otras formas que las descritas específicamente en la presente invención. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia en cuestión, enumeradas en las reivindicaciones adjuntas, tal como permite la ley pertinente.

Según se utiliza en la descripción precedente y en las siguientes reivindicaciones, los indicadores singulares (por ejemplo, “un” o “uno”) incluyen el plural, a menos que se indique lo contrario. La enumeración de un intervalo de valores discontinuos se pretende que sirva como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se incluye dentro del intervalo, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se hubiera listado individualmente.

Por lo que respecta a las reivindicaciones en particular, el término “consta esencialmente de” indica que se pueden utilizar los ingredientes o etapas no listados que no afectan materialmente a las propiedades básicas y nuevas de la presente invención, además de los ingredientes y etapas enumerados específicamente. Por otra parte, los términos “comprende” o “tiene” indican que puede estar presente cualquier ingrediente o etapa además de los enumerados. El término “consta de” indica que sólo están presentes los ingredientes o etapas enumerados, pero no elimina la posibilidad de que equivalentes de los ingredientes o etapas puedan sustituir a los enumerados específicamente.

ES 2 300 323 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de la vitamina D o de un derivado de la misma para la fabricación de un medicamento para provocar la muerte de una célula o retrasar el crecimiento de un tumor en un paciente humano, según un régimen de tratamiento que implica:
- a) la administración, en primer lugar, a la célula o al tumor en el paciente del medicamento, que comprende vitamina D o un derivado de la misma y
- 10 b) la administración posterior a la célula o al tumor de un medicamento que comprende, como mínimo, un agente citotóxico, en la que el régimen comprende, además, la administración de forma coadyuvante de, como mínimo, un bisfosfonato.
- 15 2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que la etapa a) comprende, además, la administración de un glucocorticoide simultáneamente a la vitamina D o derivado.
3. Utilización, según la reivindicación 1 ó 2, en la que, como mínimo, se selecciona un bisfosfonato del grupo que consta de alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato, y zoledronato.
- 20 4. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho agente citotóxico es un glucocorticoide.
5. Utilización de la vitamina D o un derivado de la misma para la fabricación de un medicamento para provocar la muerte de una célula o retrasar el crecimiento de un tumor en un paciente, según un régimen de tratamiento que implica
- 25 a) la administración, en primer lugar, a la célula o al tumor en el paciente del medicamento, que comprende vitamina D o un derivado de la misma y un medicamento que comprende un glucocorticoide y
- 30 b) la administración posterior a la célula o al tumor de un medicamento que comprende, como mínimo, un agente citotóxico, diferente a un glucocorticoide.
6. Utilización, según la reivindicación 5, en la que dicho régimen de tratamiento comprende, además, la etapa c) de administración de forma coadyuvante de un medicamento que comprende un bisfosfonato seleccionado del grupo que consta de alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato, y zoledronato.
- 35 7. Utilización, según la reivindicación 5 ó 6, en la que el paciente es un humano.
8. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vitamina D o el derivado se administra de 1 a 3 días anteriormente al agente citotóxico o, como mínimo, una vez diariamente en días alternos o, como mínimo, una vez diariamente durante, como mínimo, dos días seguidos.
- 40 9. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el derivado de la vitamina D es 1,25D₃ o un análogo del mismo no hipercalcémico.
- 45 10. Utilización, según la reivindicación 9, en la que el análogo es Ro23-7553 o Ro24-5531.
11. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la dosis diaria de la vitamina D o el derivado se encuentra entre 4 μ g y 15 μ g.
- 50 12. Utilización, según la reivindicación 11, en la que la dosis diaria de la vitamina D o el derivado se encuentra entre 8 μ g y 12 μ g.
13. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho agente citotóxico actúa selectivamente sobre células en la fase G₀-G₁ del ciclo celular.
- 55 14. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho agente citotóxico es un agente citotóxico basado en platino.
- 60 15. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho agente citotóxico es carboplatino, cisplatino, dexametasona, paclitaxel o docetaxel.
16. Utilización, según la reivindicación 15, en la que el agente citotóxico es carboplatino y se administra a una dosis calculada para conseguir un AUC de aproximadamente 5.
- 65 17. Utilización, según la reivindicación 15, en la que dicho agente citotóxico es dexametasona y se administra con un programa de dosis de entre 1 mg y 10 mg en días alternos.

ES 2 300 323 T3

18. Utilización, según la reivindicación 15, en la que dicho agente citotóxico es paclitaxel y se administra a una dosis de aproximadamente 80 mg/m².

5 19. Utilización de la vitamina D o un derivado de la misma y de un glucocorticoide para la fabricación de un preparado combinado para la utilización simultánea, separada o secuencial en el tratamiento del cáncer de próstata.

20. Utilización, según la reivindicación 19, en la que se repite el tratamiento.

10 21. Utilización, según las reivindicaciones 19 ó 20, en la que se administran la vitamina D o derivado y el glucocorticoide al paciente en días alternos entre 2 y 4 veces a la semana.

22. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en la que el glucocorticoide se administra al paciente antes o después de la administración de la vitamina D o del derivado.

15 23. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en la que el derivado de la vitamina D es un análogo de 1,25D₃ no hipercalcémico.

20 24. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en la que el glucocorticoide se selecciona del grupo de glucocorticoides que consta de dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, o prednisona.

25. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en la que el glucocorticoide es dexametasona.

26. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 19-25, que comprende, además, la administración a la célula de, como mínimo, un bisfosfonato seleccionado del grupo que consta de alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato y zoledronato.

27. Preparado combinado de vitamina D o un derivado de la misma y zoledronato.

30 28. Preparado combinado de vitamina D o un derivado de la misma y zoledronato, para la utilización simultánea, separada o secuencial en terapia.

29. Utilización de la vitamina D o un derivado de la misma y zoledronato para la fabricación de un medicamento para la utilización simultánea, separada o secuencial en el tratamiento del cáncer.

35 30. Utilización, según la reivindicación 29, en la que el zoledronato se administra anteriormente a la administración de la vitamina D o el derivado.

40 31. Utilización, según la reivindicación 29 ó 30, en la que el zoledronato se administra al paciente en una dosis entre 5 µg/kg de peso corporal y 25 µg/kg de peso corporal.

32. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 29-31, en la que el derivado de la vitamina D es un análogo de 1,25D₃ no hipercalcémico.

45

50

55

60

65