



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 972**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4704 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01903785 .2**
86 Fecha de presentación : **20.02.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1267848**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

54 Título: **Régimen de dosificación que comprende un inhibidor de la farnesil proteína transferasa para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **24.02.2000 US 184551 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es: **JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es: **End, David, William**

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 293 972 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

Régimen de dosificación que comprende un inhibidor de la farnesil proteína transferasa para el tratamiento del cáncer.

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con un método para tratar tumores en mamíferos mediante la administración de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa (FPT) empleando un programa de dosificación intermitente. El régimen implica la administración de un inhibidor de la FPT a lo largo de un programa de dosificación reducido de uno a cinco días por medio del cual se consiguen efectos contra el cáncer que se prolongan más allá del período de administración.

Antecedentes de la invención

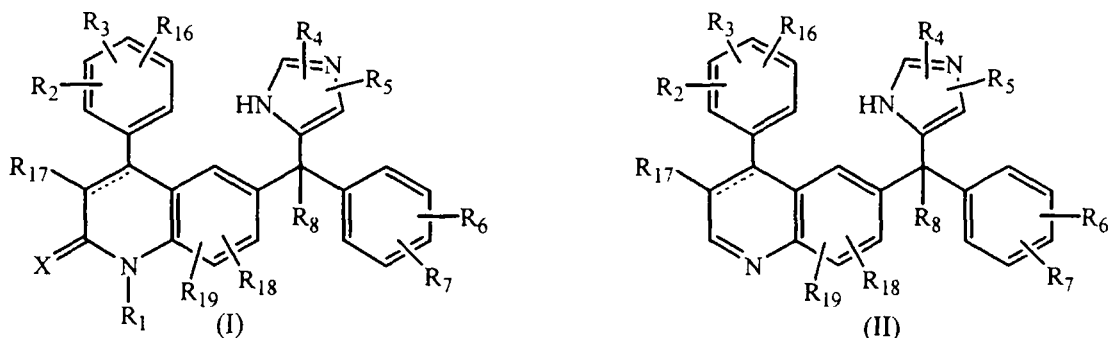
A lo largo de la última década, la investigación del cáncer ha identificado lesiones genéticas específicas que inducen una transformación maligna y dan lugar al crecimiento de tumores. Actualmente es un hecho reconocido que las mutaciones, deleciones o alteraciones en la expresión de los genes de mamífero normales que intervienen en el control del crecimiento convierten a estos "protooncogenes" en "oncogenes". La familia de oncogenes Ras formada por los oncogenes H-Ras, K-Ras y N-Ras codifican una proteína unida a GTP altamente conservada o PM = 21.000 (p21).

Los oncogenes codifican con frecuencia componentes de rutas de transducción de señales que llevan a la estimulación del crecimiento celular y a la mitogénesis. La expresión de los oncogenes en células en cultivo da lugar a la transformación celular, caracterizada por la capacidad de las células para crecer en agar blando y el crecimiento de las células como focos densos carentes de la inhibición por contacto que muestran las células no transformadas. La mutación y/o sobreexpresión de ciertos oncogenes se asocia con frecuencia al cáncer humano. Para adquirir el potencial de transformación, el precursor de la oncoproteína Ras debe experimentar la farnesilación del residuo de cisteína localizado en un motivo carboxilo terminal de un tetrapéptido. Por lo tanto, se han sugerido inhibidores de la enzima que cataliza esta modificación, la farnesil proteína transferasa, como agentes anticancerosos para los tumores en los que Ras contribuye a la transformación. En muchos tipos de cáncer humanos se encuentran con frecuencia formas oncogénicas mutadas de Ras, especialmente en más del 50% de los carcinomas de colon y pancreáticos (Kohl y otros, Science, vol. 260, 1384 a 1837, 1993).

Las proteínas producto de los oncogenes Ras han sido el foco de los esfuerzos para encontrar fármacos oncológicos, debido a algunas características únicas del metabolismo celular de dichas proteínas. Para operar en la transducción de las señales y en la transformación de las células, las proteínas Ras deben anclarse en la membrana plasmática para promover interacciones en su localización en la membrana, de proteínas adaptadoras con dominios SH2/SH3, como el complejo Grb2/SOS. La localización en la membrana de Ras también desempeña un papel en la activación de efectoras aguas abajo como la proteína quinasa Raf. Algunas proteínas Ras recientemente sintetizadas deben ser modificadas postraduccionalmente en células de mamíferos mediante farnesilación seguida por rotura proteolítica de los tres aminoácidos terminales, y carboxi-O-metilación, para dar lugar a la hidrofobicidad o sitios de reconocimiento que permitan la apropiada localización en la membrana. La modificación postraduccional inicial de Ras, limitante de la velocidad, comporta la unión covalente de farnesol a través de un enlace tioéter a un único residuo de cisteína situado cuatro aminoácidos a partir del terminal carboxi de la proteína. Esta reacción es catalizada mediante farnesil proteína transferasa (FPT). La enzima requiere únicamente los 4 aminoácidos del terminal C, o motivo CAAX, para la unión específica y la catálisis de los sustratos de proteína.

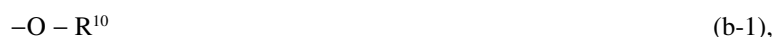
Se ha descrito que los inhibidores de la farnesil proteína transferasa son útiles en el tratamiento de diversos cánceres de mamífero y, en particular, en el tratamiento de los cánceres de colon y pancreáticos.

El documento WO-97/21701 describe la preparación, formulación y propiedades farmacéuticas de derivados de (imidazol-5-il)metil-2-quinolinona inhibidores de la farnesil proteína transferasa, de fórmulas (I), (II) y (III), así como intermedios de fórmula (II) y (III) que son metabolizados *in vivo* en compuestos de fórmula (I). Los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) se representan por



ES 2 293 972 T3

C₁₋₆, mono o di(alquil C₁₋₆)aminoalquilo C₁₋₆, imidazolilo, haloalquilo C₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆ alquilo C₁₋₆, aminocarbonilalquilo C₁₋₆, o un radical de fórmula



10 en donde

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, Ar¹, Ar²alquilo C₁₋₆, alquiloxicarbonil C₁₋₆ alquilo C₁₋₆ o un radical de fórmula -Alk²-OR¹³ ó -Alk²-NR¹⁴R¹⁵;

15 R¹¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₁₂, Ar¹ o Ar²alquilo C₁₋₆;

20 R¹² es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, alquilaminocarbonilo C₁₋₆, Ar¹, Ar²alquilo C₁₋₆, alquilcarbonil C₁₋₆ alquilo C₁₋₆, un aminoácido natural, Ar¹carbonilo, Ar²alquilcarbonilo C₁₋₆, aminocarbonilcarbonilo, alquiloxi C₁₋₆ alquilcarbonilo C₁₋₆, hidroxil, alquiloxi C₁₋₆, aminocarbonilo, di(alquil C₁₋₆)aminoalquilcarbonilo C₁₋₆, amino, alquilamino C₁₋₆, alquilcarbonilamino C₁₋₆ o un radical de fórmula -Alk²-OR¹³ ó -Alk²-NR¹⁴R¹⁵;

en donde

25 Alk² es alcanodiilo C₁₋₆;

R¹³ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, hidroxialquilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar²alquilo C₁₋₆;

30 R¹⁴ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar²alquilo C₁₋₆;

R¹⁵ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquilcarbonilo C₁₋₆, Ar¹ o Ar²alquilo C₁₋₆;

R¹⁷ es hidrógeno, halo, ciano, alquilo C₁₋₆, alquiloxicarbonilo C₁₋₆, Ar¹;

35 R¹⁸ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquiloxi C₁₋₆ o halo;

R¹⁹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₆;

40 Ar¹ es fenilo, o fenilo sustituido con alquilo C₁₋₆, hidroxil, amino, alquiloxi C₁₋₆ o halo; y

Ar² es fenilo, o fenilo sustituido con alquilo C₁₋₆, hidroxil, amino, alquiloxi C₁₋₆ o halo.

45 Los compuestos se describen generalmente como inhibidores de la farnesil proteína transferasa útiles para el tratamiento de tumores en mamíferos. Generalmente, en el tratamiento de tumores cancerosos se administran aproximadamente desde 0,01 mg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa dosificado en forma de aproximadamente dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Este programa de dosificación se basa en la hipótesis de que eran necesarias la exposición continua al compuesto activo y la consecuente inhibición de la FPT para mantener los efectos antitumorales.

50 Inesperadamente, se ha comprobado que un régimen de dosificación interrumpido de aproximadamente cinco días que contenga un cierto inhibidor de la farnesil proteína transferasa como ingrediente activo seguido por aproximadamente dos semanas sin tratamiento da como resultado la supresión del crecimiento del tumor en un mamífero.

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un régimen de dosificación que comprende un programa de dosificación discontinuo en el que se administra un inhibidor de la farnesil proteína transferasa para suprimir el crecimiento de un tumor en un mamífero. El régimen comprende la administración de una única dosis de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa a lo largo de un período de uno a cinco días seguida por al menos dos semanas sin tratamiento.

60 Sumario de la invención

65 La presente invención está relacionada con un método para tratar tumores en mamíferos que comprende la administración de una única dosis de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa a lo largo de un período de uno a cinco días. La invención también está relacionada con un régimen de dosificación antitumoral en el que la supresión del crecimiento del tumor se consigue mediante la administración de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa a lo largo de un período de uno a cinco días, seguida por al menos dos semanas sin tratamiento. La exposición transitoria de uno a cinco días de los tumores de mamífero a un inhibidor de la farnesil proteína transferasa produce

efectos antitumorales sostenidos. La inhibición de la FPT por un inhibidor de la FPT sometido al método y al régimen de la presente invención produce alteraciones de larga duración en el proceso maligno, que sólo se restablecen muy lentamente.

5 Descripción detallada de la invención

Es conocido que los inhibidores de la farnesil transferasa (FPT) son útiles en el tratamiento de tumores en mamíferos y, en particular, los carcinomas de colon y pancreáticos. En estudios previos se ha mostrado que los inhibidores de la farnesil proteína transferasa inhiben el crecimiento de los tumores en mamíferos cuando se administran mediante un programa de dosificación consistente en dos administraciones por día. Inesperadamente, se ha comprobado que la administración de un cierto inhibidor de la farnesil proteína transferasa, en concreto el (+)-6-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1*H*-imidazol-5-il)metil]-4-(3-clorofenil)-1-metil-2(1*H*)-quinolinona (Compuesto 75 en la Tabla 1 de la parte experimental del documento WO-97/21701), o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo, en una única dosis diaria durante uno a cinco días daba lugar a una notable supresión del crecimiento del tumor que se prolongaba durante al menos 21 días. En particular, la administración del inhibidor de la farnesil proteína transferasa en una sola dosis entre 50-200 mg/kg de peso corporal una vez al día durante uno a cinco días consecutivos tras la formación del tumor da lugar a una notable supresión del crecimiento del tumor que se prolonga durante al menos 21 o más días. El efecto es equivalente al de la administración de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa de forma continua en una dosis diaria de 50 mg/kg-100 mg/kg en el mismo modelo de tumor. Al volver a aparecer el crecimiento en tumores tratados según el método y/o régimen de la invención, un nuevo ataque con el inhibidor de la FPT a los 21 días daba lugar a la detención del crecimiento, lo que indica que el crecimiento del tumor no procedía de células tumorales resistentes. La dosis más preferida es de 200 mg/kg. En el hombre, a partir de datos iniciales de la Fase 1, se puede esperar que la dosis preferida varíe desde 200 hasta 2400 mg. El hallazgo de que se puede lograr una supresión persistente del crecimiento del tumor con sólo uno a cinco días de tratamiento con un inhibidor de la farnesil proteína transferasa resultó inesperado debido a que se ha dado por hecho que los inhibidores de la farnesil proteína transferasa en conjunto requerirían una exposición continua crónica para mantener la inhibición ininterrumpida de la farnesilación de la proteína.

Debe entenderse que las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, tal como se han mencionado más arriba en la presente solicitud, comprenden las formas de sales de adición de ácido no tóxicas y terapéuticamente activas que el compuesto anterior del que derivan es capaz de formar. El compuesto del que derivan se puede convertir en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables tratando dicho compuesto con un ácido apropiado. Los ácidos apropiados comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos hidrácidos, p.e., ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares, o ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico, malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, *p*-toluensulfónico, ciclámico, salicílico, *p*-aminosalicílico, pamóico y similares.

Los términos sal de adición de ácido también comprenden los hidratos y las formas de adición de solvente que el compuesto del que derivan es capaz de formar. Ejemplos de tales formas son, p.e., hidratos, alcoholatos y similares.

Esta invención es especialmente aplicable al tratamiento de tumores que expresan un oncogén Ras activado. Ejemplos de tumores que pueden ser inhibidos incluyen, pero no se limitan a, el cáncer de pulmón (p.e., el adenocarcinoma, e incluso el cáncer de pulmón de células no pequeñas), los cánceres pancreáticos (p.e., el carcinoma pancreático, como, por ejemplo, el carcinoma pancreático exocrino), los cánceres de colon (p.e., los carcinomas colorrectales, como, por ejemplo, el adenocarcinoma de colon y el adenoma de colon), los tumores hematopoyéticos de linaje linfoide (p.e., la leucemia linfocítica aguda, el linfoma de células B, el linfoma de Burkitt), las leucemias mieloides (por ejemplo, la leucemia mielógena aguda (AML)), el cáncer folicular de tiroides, el síndrome mielodisplásico (MDS), los tumores de origen mesenquimático (p.e., los fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), los melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumores benignos de la piel, (p.e., los queratoacantomas), el carcinoma de mama (p.e., el cáncer de mama avanzado), el carcinoma de riñón, el carcinoma de ovario, el carcinoma de vejiga y el carcinoma de piel.

El inhibidor de la farnesil proteína transferasa mencionado más arriba empleado de acuerdo con la invención se puede preparar y formular en composiciones farmacéuticas mediante métodos conocidos en la técnica y, en particular, según los métodos descritos en el documento WO-97/21701. Para preparar las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, se combinan en una mezcla íntima una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición, como ingrediente activo, con un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede adoptar una amplia variedad de formas en función de la forma de preparación deseada para su administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en forma de dosis unitaria apropiada, preferiblemente, para administración sistémica como, por ejemplo, administración por vía oral, percutánea o parenteral, o administración tópica como, por ejemplo, mediante inhalación, difusor nasal, gotas oculares o mediante crema, gel, champú y similares. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación por vía oral se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas por vía oral como, por ejemplo, suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o excipientes sólidos como, por ejemplo, almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma más ventajosa de dosis unitaria por vía oral, en cuyo caso se emplean, obviamente, excipientes farmacéuticos sólidos. Para las composiciones por vía parenteral, el excipiente comprenderá usualmente

agua esterilizada, al menos en gran parte, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, para favorecer la solubilidad. Se pueden preparar, por ejemplo, soluciones inyectables en las que el excipiente comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de soluciones salina y de glucosa. Las soluciones inyectables que contienen compuestos de fórmula (I) se pueden formular en un aceite para conseguir una acción prolongada. Los aceites apropiados para este fin son, por ejemplo, los aceites de cacahuete, de sésamo, de semilla de algodón, de maíz, de soja, ésteres de glicerol sintéticos de ácidos grasos de cadena larga y mezclas de estos y otros aceites. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear excipientes líquidos apropiados, agentes antideposición y similares. En las composiciones apropiadas para administración por vía percutánea, el excipiente comprende, opcionalmente, un agente favorecedor de la penetración y/o un agente humedecible apropiado, combinado opcionalmente con aditivos apropiados de cualquier naturaleza en proporciones minoritarias, aditivos que no tienen ningún efecto deletéreo significativo sobre la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser de ayuda para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones se pueden administrar de diversas formas, p.e., como parche transdérmico, como spot-on (administración mediante pipeta) o como un ungüento. Como composiciones apropiadas para administración tópica se pueden citar todas las composiciones empleadas habitualmente para la administración por vía tópica de medicamentos, p.e., cremas, gelatinas, apósitos, champús, tinturas, pastas, ungüentos, pomadas, polvos y similares. La aplicación de dichas composiciones puede realizarse mediante aerosol, p.e., con un propelente, como, por ejemplo, nitrógeno, dióxido de carbono, un freón, o sin un propelente, como, por ejemplo, un difusor de bomba, gotas, lociones; o semisólidos, como, por ejemplo, una composición densa que se puede aplicar mediante una torunda. En particular, se utilizarán convenientemente las composiciones semisólidas como, por ejemplo, pomadas, cremas, gelatinas, ungüentos y similares.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas antes mencionadas en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosis unitaria, tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones en la presente solicitud, se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosis unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico requerido. Ejemplos de tales formas de dosificación unitaria son los comprimidos (incluidos comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvo, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples diferenciados de los mismos.

El inhibidor de la farnesil transferasa mencionado más arriba se puede utilizar en combinación con uno o más agentes anticancerosos diferentes como, por ejemplo, compuestos de coordinación de platino, por ejemplo, cisplatino o carboplatino; compuestos de taxano, como, por ejemplo, paclitaxel o docetaxel; compuestos de camptotecina, como, por ejemplo, irinotecano o topotecano; alcaloides de vinca antitumorales, como, por ejemplo, vinblastina, vincristina o vinorelbina, derivados antitumorales de nucleósidos, como, por ejemplo, 5-fluorouracilo, gemcitabina o capecitabina; mostaza de nitrógeno o agentes alquilantes de nitrosourea, como, por ejemplo, ciclofosfamida, clorambucil, carmustina o lomustina; derivados antitumorales de la antraciclina, como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina o epirubicina; anticuerpos HER2, como, por ejemplo, trastuzumab; derivados antitumorales de la podofilotoxina, como, por ejemplo, etopósido y tenipósido; y agentes antiestrógenos, incluyendo antagonistas de los receptores de estrógenos o moduladores de los receptores de estrógenos selectivos, preferiblemente tamoxifeno, o, alternativamente, toremifeno, droloxifeno, faslodex y raloxifeno, o inhibidores de la aromatasa como, por ejemplo, exemestano, anastrozol, letrozol y vorozol.

El inhibidor de la farnesil transferasa y el agente anticanceroso adicional se pueden administrar simultáneamente (p.e., en composiciones separadas o unitarias) o uno tras otro en cualquier orden. En este último caso, los dos compuestos se administrarán en un período y en una cantidad y manera que sean suficientes para asegurar que se logra un efecto ventajoso o sinérgico. Se observará que el método y el orden preferidos de administración y las respectivas cantidades y regímenes de dosificación para cada componente de la combinación dependerán del inhibidor de la farnesil transferasa particular y de los agentes anticancerosos adicionales que se estén administrando, su ruta de administración, el tumor particular que se esté tratando y el sujeto particular que esté siendo tratado. El método y orden de administración y las cantidades y regímenes de dosificación óptimos podrán ser determinados fácilmente por aquellos expertos en la técnica utilizando métodos convencionales y teniendo en cuenta la información expuesta en la presente solicitud.

El inhibidor de la FPT para ser utilizado de acuerdo con la presente invención se puede preparar de una manera convencional, por ejemplo, mediante los procesos descritos en las descripciones de patente que anteceden.

Los siguientes ejemplos describen la invención con mayor detalle.

60 Ejemplo 1

Materiales y métodos

65 *Cultivo Celular*: Se adquirieron células de carcinoma pancreático humano CAPAN-2 procedentes de American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las células se conservaron en un medio McCoy's 5A suplementado con un 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina. Se obtuvieron células NIH 3T3 transfectadas con el oncogén H-Ras T24 activado (células T24) de la Janssen Research Foundation (para los métodos, véase Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C. y Weinberg, R. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras*

ES 2 293 972 T3

gene. Nature 297: 474-478, 1982; Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S., y Barbacid, M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB-and Harvey-MSV transforming genes. Nature 298: 343-347, 1982). Las células T24 se conservaron como cultivos monocapa en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de Nu-serum Tipo IV (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) y 40 µg/ml de G418 (Geneticin®, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD).

Animales: Se adquirieron ratones nude nu/nu hembra inmunodeficientes (de 42 días de edad) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los ratones se alojaron de cinco en cinco en jaulas de microaislamiento colocadas en estanterías de flujo laminar para mantener la esterilidad. Todos los lechos, alimentos, agua y jaulas fueron esterilizados. Los animales se manejaron dentro de los confines estériles de una cabina de flujo laminar. Por lo demás, los ratones se mantuvieron sometidos a condiciones de vivero estándar. Los estudios tumorales se llevaron a cabo según un protocolo aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee.

Estudios de Tumores en Ratones Nude: Se separaron las células que crecían como monocapas en frascos de cultivo de tejidos T150 mediante tripsinización con 10 ml de tripsina al 0,05% y 0,53 mM de EDTA por frasco. Se combinaron las suspensiones de células tumorales y se inactivó la tripsina mediante la adición de un medio que contenía suero (10 ml por cada 40 ml de suspensión celular de tripsina). Las células se recogieron mediante centrifugación y se volvieron a suspender en una solución salina equilibrada de Hank (HBSS) calentada a 37°C. Se añadió una porción de 1,0 ml de suspensión celular a 20 ml de diluyente y se sometió a recuento en un contador de partículas Coulter. Las suspensiones de células se volvieron a centrifugar y a suspender a una concentración de 1×10^6 células por 0,10 ml de HBSS. Los ratones fueron inoculados con una sola inyección subcutánea de 0,10 ml de suspensión de células tumorales en la región inguinal. Los ratones se alojaron de cinco en cinco en jaulas, siendo asignados 15 ratones a cada grupo de tratamiento. Se midieron semanalmente el peso corporal y el tamaño de los tumores, determinados mediante mediciones con calibrador. Se multiplicaron las medidas de longitud y anchura obtenidas con el calibrador para obtener las superficies de los tumores. Al finalizar el estudio, los ratones fueron sacrificados mediante asfixia por CO₂.

Tres días después de la inoculación de los tumores, se inició el tratamiento de cinco días con (R)-6-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1H-imidazol-5il)metil]-4-(3-clorofenil)-1-metil-2(1H)-quinolinona (compuesto 1). El compuesto 1 se administró una vez al día mediante alimentación forzada por vía oral en un vehículo de betaciclodextrina al 20% en forma de un volumen de 0,10 ml de solución por cada 10 g de peso corporal. Los grupos de control recibieron el mismo volumen de dosis del vehículo de betaciclodextrina al 20%.

Compuestos. El compuesto 1 se preparó para administración por vía oral disolviendo en primer lugar el compuesto en forma de solución patrón concentrada 2x en hidroxipropil betaciclodextrina al 40% (lote n° 051-071/1) en HCl 0,1 N. El compuesto 1 se disolvió mediante agitación vigorosa durante aproximadamente 30 minutos, seguida por sonicación durante 10 min. Las soluciones del compuesto 1 se llevaron a una concentración final diluyéndolas en una proporción de 1:1 con HCl 0,1 N. Las soluciones finales del fármaco se sometieron inmediatamente a filtrado estéril y se transfirieron a tubos esterilizados. Las soluciones se almacenaron refrigeradas y protegidas de la luz durante el transcurso del estudio y la esterilidad se mantuvo abriendo las soluciones en condiciones de flujo laminar estéril.

Resultados y exposición

En la figura 1 se presentan los resultados del estudio de la dosificación intermitente del compuesto 1. El compuesto 1 se administró una vez al día durante cinco días cada tres semanas a ratones nude portadores de tumores H-Ras T24. Los animales tratados con el vehículo mostraron tumores que crecían agresivamente 14 días después de la inoculación. Este grupo fue sacrificado el día 17, porque sus tumores excedían la pauta ética de que el peso del tumor no debe ser mayor que el 10% del peso corporal del animal. Los ratones tratados con 200 mg/kg del compuesto 1 durante cinco días (días 3 - 8 tras la inoculación del tumor) mostraron tumores pequeños el día 17. Al dejarlos sin tratamiento, los tumores volvieron a las rápidas tasas de crecimiento del control el día 24. Los animales fueron sacrificados el día 28 de acuerdo con las pautas éticas. Otro grupo de 15 ratones recibió un tratamiento adicional de 5 días con 200 mg/kg del compuesto 1. El crecimiento de los tumores se detuvo de nuevo, pero no de forma tan considerable como en el tratamiento inicial.

Se analizó un régimen de dosificación idéntico en tumores pancreáticos humanos CAPAN-2 en ratones nude. La administración del compuesto 1 durante cinco días en una dosis de 200 mg/kg redujo significativamente el crecimiento de los tumores CAPAN-2 hasta el día 24 (figura 2). A partir de entonces, los tumores que no recibieron más tratamiento volvieron a las tasas de crecimiento observadas en los controles tratados con el vehículo. De nuevo, otro grupo de 15 animales recibió un tratamiento adicional de 5 días con el compuesto 1 los días 21 a 25. Únicamente se produjo una detención transitoria del crecimiento, que resultó significativa el día 28 del estudio. Aunque la respuesta de los tumores CAPAN-2 no fue tan espectacular como la de los tumores T24, los presentes resultados son destacables cuando se comparan con los de estudios previos. En nuestra evaluación original de los tumores CAPAN-2 con el compuesto 1 administrado dos veces al día de forma continua durante 18 días, dosis de 50 mg/kg (100 mg/kg de dosis diaria total) y 100 mg/kg (200 mg/kg) dieron lugar a reducciones significativas del crecimiento de los tumores. El programa de dosificación de 5 días supuso una reducción importante en la exposición al fármaco a este estudio previo. No obstante, todavía se mantenía un efecto antitumoral.

Se exploró la dependencia de la dosis del programa de dosificación reducido de 5 días en tumores T24 con dosis del compuesto 1 de 50, 100 y 200 mg/kg. La duración de la respuesta resultó estar relacionada con la dosis, produciendo

también esta vez la dosis de 200 mg efectos sostenidos hasta el día 17 del estudio (figura 3). Los efectos supresores del tumor de las dosis más bajas desaparecieron hacia el día 14. En todos los grupos tratados con el compuesto 1 todavía se observaron el día 17 del estudio reducciones significativas y relacionadas con la dosis del crecimiento de los tumores, medidas como superficie final del tumor (figura 4) y peso final del tumor (figura 5). La dosis más alta experimentada, de 200 mg/kg, resultó sustancialmente más efectiva que las dosis más bajas, observándose una reducción de un 90% del peso final de los tumores.

Finalmente, los animales fueron tratados con una sola administración del compuesto 1 para estudiar la duración mínima de la exposición al inhibidor de la FPT necesaria para elicitar un efecto antitumoral. Como se muestra en la figura 6, una sola dosis de 200 mg/kg ó 400 mg/kg del compuesto 1 administrada tres días después de la inoculación del tumor produjo una inhibición sostenida del crecimiento de los tumores que se mantuvo hasta 15 días.

Los presentes estudios demuestran que exposiciones breves de cinco días al compuesto 1 pueden producir efectos antitumorales que persisten durante otras dos semanas o incluso más después del tratamiento.

Figura 1. Inhibición del crecimiento de tumores en células NIH3T3 transformadas por H-Ras T24 mediante la administración del compuesto 1 en forma de tratamientos intermitentes de cinco días. Se inocularon unos ratones nude con 1×10^6 células T24 por vía subcutánea el día 0. Después de tres días se inició la dosificación por vía oral del vehículo de betaciclodextrina (100 μ l por cada 10 gm de peso corporal) o del compuesto 1 (200 mg/kg). Uno de los grupos fue tratado durante otros cinco días a partir del día 21. El tamaño de los tumores está expresado como superficie del tumor (longitud \times anchura). Los valores son promedios (\pm EMM) para N = 14-15 animales por grupo sometido a tratamiento. Para mayor claridad de la figura, los valores significativamente diferentes ($p < 0,05$ ANOVA) del grupo tratado con el vehículo se indican (*) únicamente para el día 21. Los efectos significativos para el segundo ciclo de tratamiento con el compuesto 1 se indican para el día 28 (**).

Figura 2. Inhibición del crecimiento en tumores pancreáticos humanos CAPAN-2 producida por tratamientos intermitentes de cinco días con el compuesto 1 (200 mg/kg, p.o.). Se inocularon ratones nude con 1×10^6 células CAPAN-2 por vía subcutánea. Después de tres días se inició la dosificación por vía oral del vehículo de betaciclodextrina (100 μ l por cada 10 gm de peso corporal) o del compuesto 1 (200 mg/kg). Uno de los grupos fue tratado durante otros cinco días a partir del día 21. El tamaño de los tumores está expresado como superficie del tumor (longitud \times anchura). Los valores son promedios (\pm EMM) para N = 14-15 animales por grupo sometido a tratamiento. Para mayor claridad de la figura, los valores significativamente diferentes ($p < 0,05$ ANOVA) del grupo tratado con el vehículo se indican (*) para el día 24. Los efectos significativos para el segundo ciclo de tratamiento con el compuesto 1 se indican para el día 28 (**).

Figura 3. Transcurso del tiempo para la inhibición del crecimiento de tumores en células NIH3T3 transformadas por H-Ras T24 mediante la administración del compuesto 1 en forma de un único tratamiento de cinco días. Se inocularon ratones nude con 1×10^6 células T24 por vía subcutánea el día 0. Después de tres días se inició la dosificación por vía oral del vehículo de betaciclodextrina (100 μ l por cada 10 gm de peso corporal) o de las dosis indicadas del compuesto 1 mediante alimentación forzada por vía oral. El tamaño de los tumores está expresado como superficie del tumor (longitud \times anchura). Los valores son promedios para N = 14-15 animales por grupo sometido a tratamiento. En las figuras 4 y 5 se muestran análisis estadísticos de las mediciones de los tumores tomadas al finalizar el estudio el día 17.

Figura 4. Inhibición del crecimiento de tumores en células NIH3T3 transformadas por H-Ras T24 mediante la administración del compuesto 1 en forma de un único tratamiento de cinco días. Se inocularon ratones nude con 1×10^6 células T24 por vía subcutánea el día 0. Después de tres días se inició la dosificación por vía oral del vehículo de betaciclodextrina (100 μ l por cada 10 gm de peso corporal) o de las dosis indicadas del compuesto 1 mediante alimentación forzada por vía oral. El tamaño de los tumores está expresado como superficie del tumor (longitud \times anchura). Los valores son promedios (\pm EMM) para N = 14-15 animales por grupo sometido a tratamiento. Los valores que aparecen con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$ ANOVA). Sobre cada barra del histograma se muestra el porcentaje de reducción del tamaño del tumor.

Figura 5. Inhibición del crecimiento de tumores en células NIH3T3 transformadas por H-Ras T24 mediante la administración del compuesto 1 en forma de un único tratamiento de cinco días. Se inocularon ratones nude con 1×10^6 células T24 por vía subcutánea el día 0. Después de tres días se inició la dosificación por vía oral del vehículo de betaciclodextrina (100 μ l por cada 10 gm de peso corporal) o de las dosis indicadas del compuesto 1 mediante alimentación forzada por vía oral. El tamaño de los tumores está expresado como peso post mortem del tumor (g). Los valores son promedios (\pm EMM) para N = 14-15 animales por grupo sometido a tratamiento. Los valores que aparecen con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$ ANOVA). Sobre cada barra del histograma se muestra el porcentaje de reducción del peso del tumor.

Figura 6. Transcurso del tiempo para la inhibición del crecimiento de tumores en células NIH3T3 transformadas por H-Ras T24 mediante la administración del compuesto 1 en forma de un único tratamiento. Se inocularon ratones nude con 1×10^6 células T24 por vía subcutánea el día 0. Después de tres días se inició la dosificación por vía oral del vehículo de betaciclodextrina (100 μ l por cada 10 gm de peso corporal) o de las dosis indicadas del compuesto 1 mediante alimentación forzada por vía oral. El tamaño de los tumores está expresado como superficie del tumor (longitud \times anchura). Los valores son promedios para N = 14-15 animales por grupo sometido a tratamiento.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un inhibidor de la farnesil proteína transferasa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en mamíferos, en el que el inhibidor de la farnesil proteína transferasa es (+)-6-[amino(4-clorofenil)(1-metil-1*H*-imidazol-5-il)metil]-4-(3-cloro-fenil)-1-metil-2(1*H*)-quinolinona, o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo, que se administra en un ciclo de dosificación que comprende la administración de dicho inhibidor de la farnesil transferasa una vez al día en una dosis de 50 a 200 mg/kg de peso corporal a lo largo de un período de uno a cinco días, seguido por un período de al menos catorce días, período durante el cual no se administra dicho inhibidor de la farnesil transferasa, repitiéndose dicho ciclo al menos una vez.

10 2. Uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la farnesil proteína transferasa se administra durante 1 día.

15 3. Uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la farnesil proteína transferasa se administra durante 5 días.

20 4. Uso según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho inhibidor de la farnesil proteína transferasa se administra en una forma de dosis unitaria.

25 5. Uso según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho inhibidor de la farnesil proteína transferasa se utiliza en conjunción con uno o más agentes anticancerosos diferentes.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

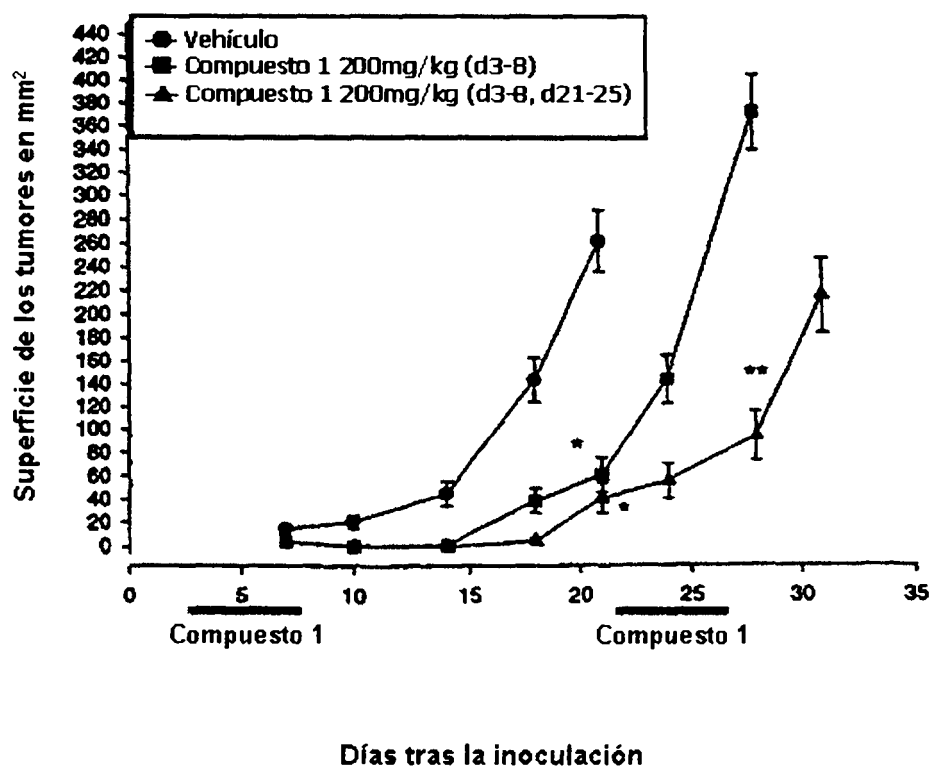


FIGURA 2

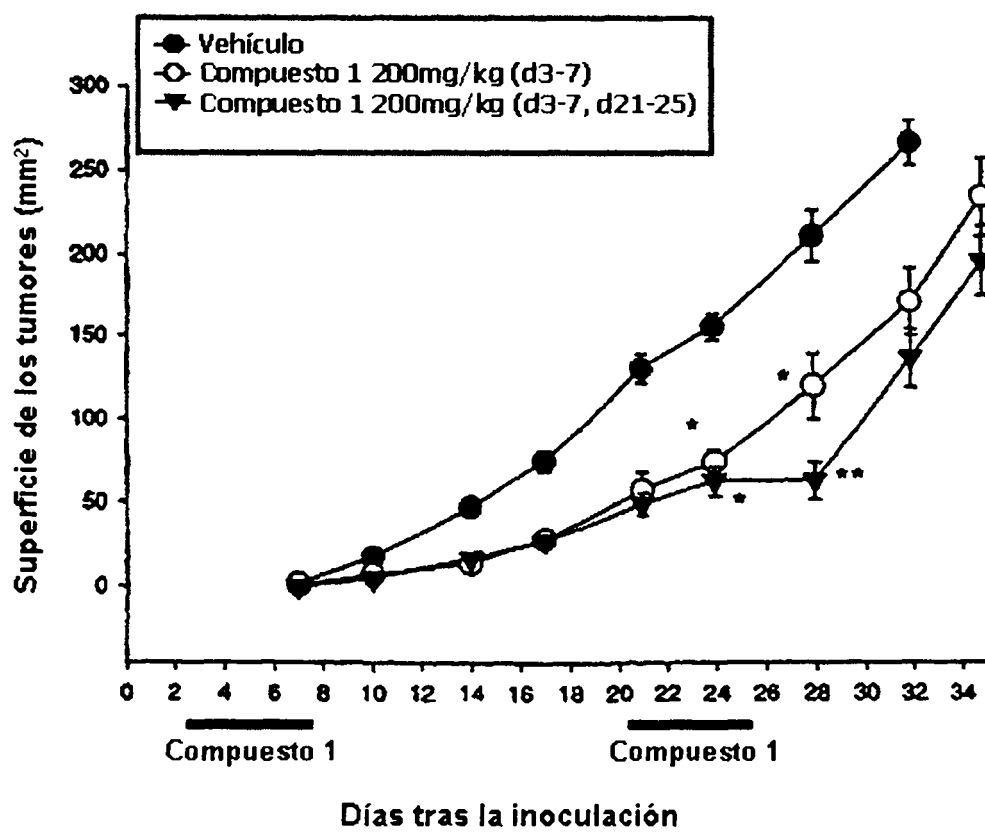


FIGURA 3

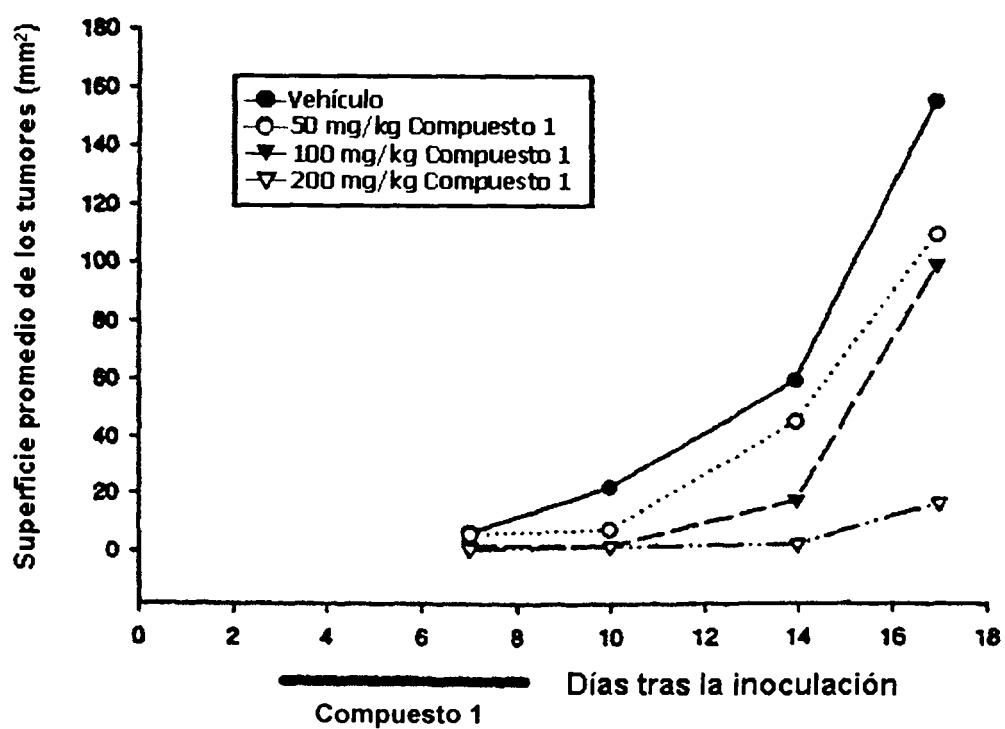


FIGURA 4

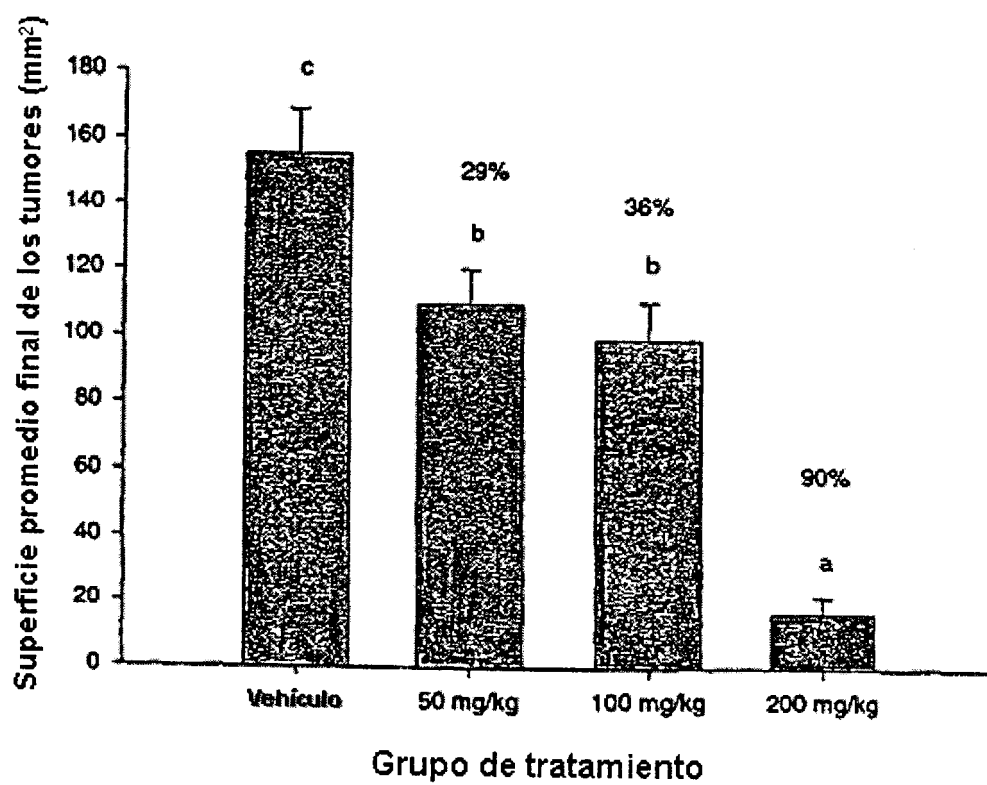


FIGURA 5

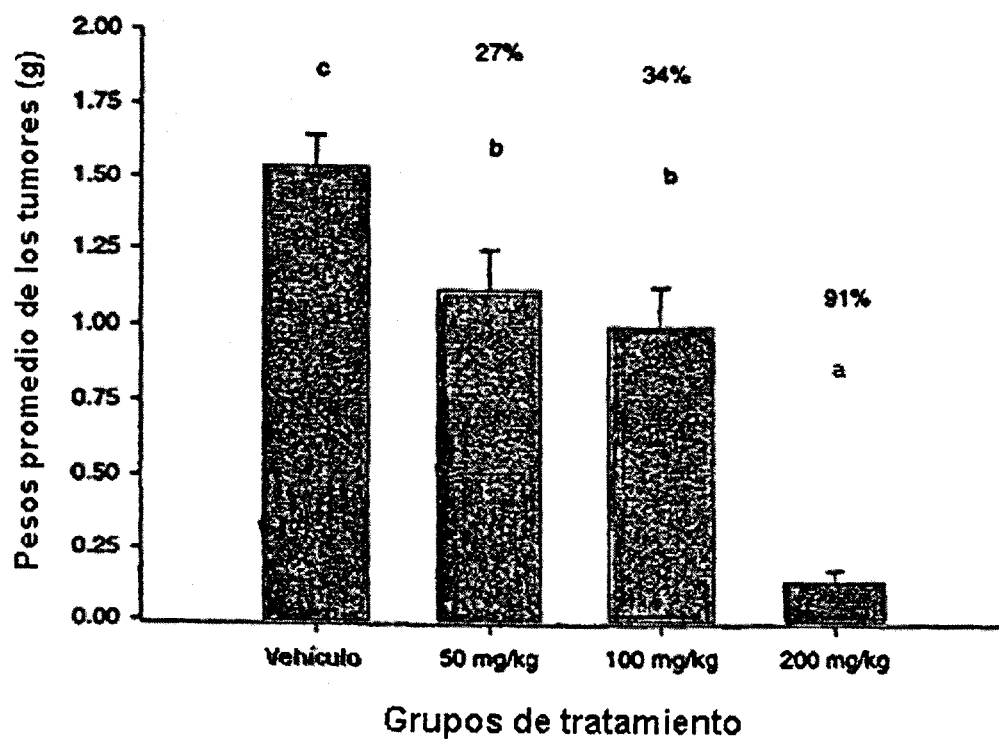


FIGURA 6

**Superficie de los Tumores T24
Compuesto 1 Administrado en una Sola Dosis por Vía Oral**

