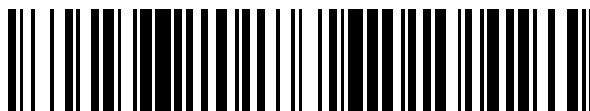


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 689**

51 Int. Cl.:

A01N 43/58 (2006.01)

A61K 31/50 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2011 E 11790419 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2575466**

54 Título: **Métodos para tratar trastornos resistentes a metotrexato con 10-propargil-2-desazaaminopterin**

30 Prioridad:

02.06.2010 US 350871 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.07.2015

73 Titular/es:

**ALLOS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
11080 Circle Point Road Suite 200
Westminster, CO 80020, US**

72 Inventor/es:

PRONK, GIJSBERTUS J.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 541 689 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

Métodos para tratar trastornos resistentes a metotrexato con 10-propargil-2-desazaaminopterina

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El metotrexato (también llamado "MTX,") se usa como parte de regímenes de quimioterapia combinada para tratar muchos tipos de cánceres. Es un tratamiento de muchos trastornos neoplásicos, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda. El metotrexato también se usa como tratamiento para algunas enfermedades autoinmunes, incluyendo la miastenia grave, polimiositis, la dermatomiositis, la miositis de cuerpos de inclusión, la espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, la psoriasis pustulosa, la artritis psoriásica, artritis reumatoide, la granulomatosis de Wegener y la esclerodermia.

La 10-propargil-10-desazaaminopterina (que abarca "10-propargil-10=dAM", "pralatrexato", "PDX racémico", "ácido (2S)-2-[[4-[(1RS)-1-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil]but-3-inil]benzoil]amino]pentanodioico", "ácido (2RS)-2-[[4-[(1RS)-1-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil]but-3-inil]benzoil]amino]pentanodioico", y "PDX"), es un compuesto que se ha ensayado y encontrado útil en el tratamiento del cáncer. La 10-propargil-10-desazaaminopterina ha sido aprobada por la U.S. Food and Drug Administration (FDA, Agencia de los Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) como tratamiento para el linfoma de células T recidivante y refractario. La 10-propargil-10-desazaaminopterina también se está investigando para su uso en linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, y cáncer de mama.

La 10-propargil-10-desazaaminopterina se divulgó originalmente por DeGraw et al., "Synthesis and Antitumor Activity of 10-Propargyl-10-deazaaminopterin", J. Med. Chem. 36: 2228- 2231 (1993) y ha demostrado actuar como un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa ("DHFR") y como un inhibidor del crecimiento en la línea celular de leucemia linfocítica L1210 murina. Además, se presentaron algunos resultados de los efectos antitumorales del compuesto usando el modelo de tumor mamario murino E0771.

La Patente de Estados Unidos N° 6.028.071 y la Publicación PCT N° WO 1998/02163 divulgan que cuando se ensayaron composiciones de 10-propargil-10-desazaaminopterina en un modelo de xenoinjerto tienen eficacia frente a tumores humanos. Estudios posteriores con 10-propargil-10-desazaminopterina han demostrado que es útil por sí misma y en combinaciones con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, Sirotnak et al., Clinical Cancer Research Vol. 6, 3705-3712 (2000) comunican que la administración conjunta de 10-propargil-10-desazaminopterina y probenecid, un inhibidor de una ATPasa similar a cMOAT/MRP, potencia en gran medida la eficacia de la 10-propargil-10-desazaminopterina contra tumores sólidos humanos. La 10-propargil-10-desazaminopterina y combinaciones de 10-propargil-10-desazaminopterina con agentes quimioterapéuticos basados en platino han demostrado ser eficaces contra el mesotelioma. (Khokar, et al., Clin. Cancer Res. 7: 3199-3205 (2001). La administración conjunta con gemcitabina (Gem), para el tratamiento del linfoma, se ha divulgado en el documento WO/2005/117892. Las combinaciones de 10-propargil-10-desazaminopterina con taxoles se divulgan como eficaces en la Patente de Estados Unidos N° 6.323.205. La 10-propargil-10-desazaminopterina también ha demostrado ser eficaz para el tratamiento del linfoma de células T, véase la Patente de los Estados Unidos N° 7.622.470. Otros estudios han demostrado un método para evaluar la sensibilidad de un linfoma al tratamiento con 10-propargil-10-desazaminopterina determinando la cantidad de proteína portadora 1 de folato (RFC-1) expresada por la muestra, en el que un nivel mayor de RFC-1 expresada es indicativo de una mayor sensibilidad a 10-propargil-10-desazaminopterina, divulgado en la Publicación PCT N° WO 2005/117892.

La 10-propargil-10-desazaminopterina se conoce como un antifolato/antimetabolito. La ruta del folato juega un papel clave en el crecimiento y la proliferación celular (Appling, 1991; Odin et al, 2003). El ácido fólico (folato) entre en las células a través del transportador 1 de folato reducido (RFC-1), se poliglutamata por la folilpoliglutamato sintetasa (FPGS), y se reduce a dihidrofolato, que se convierte posteriormente a tetrahidrofolato (THF) mediante la dihidrofolato reductasa (DHFR). Las diferentes enzimas y transportadores implicados en esta ruta son dianas para una clase importante de agentes citotóxicos: los antifolatos. El metotrexato fue uno de los primeros agentes de esta clase, y se usó por primera vez en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil (Farber et al, 1948). Desde entonces, se ha usado ampliamente el metotrexato en cánceres hematológicos y sólidos y se han diseñado racionalmente nuevas generaciones de antifolatos para explotar múltiples aspectos de la ruta del folato (por ejemplo, el raltitrexed en el cáncer colorrectal (Cocconi et al, 1998), y el pemetrexed en los mesoteliomas malignos pleurales (Vogelzang et al, 2003) y carcinomas no microcíticos de pulmón (NSCLC) (Hanna et al, 2004)). En la mayoría de las células tumorales, RFC-1 media la internalización de los análogos de folato. Una vez dentro de la célula, estos análogos se unen bien a dihidrofolato reductasa (DHFR), vaciando de este modo los depósitos de folato reducido necesarios para la biosíntesis de la purina y la timidina, o se metabolizarán a poliglutamatos antes de unirse a DHFR. La poliglutamación está catalizada por la folil-poliglutamato sintetasa (FPGS). La folil-poliglutamato hidrolasa (FPGH, también conocida como gamma-glutamil hidrolasa [GGH]) media en la escisión y por lo tanto en la posterior eliminación de estos antifolatos poliglutamatos intracelulares. La timidilato sintasa (TS) y la glicinamida ribonucleótido formil transferasa (GARFT) también están implicadas en el metabolismo del folato como enzimas "recicladoras" (afectando de este modo directamente a los depósitos de nucleótidos disponibles para la síntesis de ADN).

El metotrexato es un antifolato. Basándose en el ensayo de líneas celulares, se cree que la 10-propargil-10-desazaminopterina y el metotrexato tienen un patrón similar de citotoxicidad, siendo la 10-propargil-10-desazaminopterina frecuentemente de 3 a 19 veces más potente que el metotrexato.

La resistencia al metotrexato aparece normalmente como resultado de una mutación o de la amplificación del gen de DHFR. Se conocen tres vías por las que una célula puede adquirir inmunidad a los efectos de este antagonista del folato. La concentración de metotrexato en la célula puede disminuirse por un cambio en los sistemas de transporte que mueven el fármaco al interior y al exterior de la célula. Por ejemplo, si hay una reducción en el número de transportadores a través de los cuales se capta el metotrexato por parte de las células, se encontrará menor cantidad en la célula. También, la concentración del fármaco en la célula puede regularse por las velocidades alteradas de poliglutamación y del metabolismo. Cuando el fármaco se poliglutamata más lentamente o se metaboliza más rápidamente puede eliminarse más fácilmente de la célula, disminuyendo su concentración y actividad en el interior de la célula. La amplificación del gen de DHFR provoca un aumento en la cantidad de DHFR presente y se ha demostrado que está correlacionado con la respuesta reducida al tratamiento con metotrexato. El metotrexato tiene que unirse a DHFR para evitar su actividad. Si un cambio genético altera la región de unión de DHFR de tal forma que reduce la unión de metotrexato, DHFR puede seguir activando folatos y disminuirá la eficacia del tratamiento. Todos estos resultados se han implicado en la resistencia aumentada al metotrexato. La resistencia al metotrexato puede adquirirse rápidamente, y puede dar lugar a un fracaso del tratamiento.

Por lo tanto, serían útiles métodos para superar la resistencia adquirida al metotrexato.

SUMARIO DE LA INVENCION

En una realización, la presente invención incluye un método para tratar un trastorno resistente a metotrexato en un individuo. Este método puede incluir administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende 10-propargil-10-desazaminopterina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, la presente invención incluye un método para tratar a un individuo que necesite tratamiento para una neoplasia resistente al metotrexato, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de 10-propargil-10-desazaminopterina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, el trastorno es un cáncer. En otras realizaciones, el trastorno es un trastorno inflamatorio. En una realización, la composición se formula para administración intravenosa. En otra, la composición se formula para administración oral.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra un esquema sintético útil para preparar 10-propargil-10-desazaminopterina;

La FIG. 2 muestra la sensibilidad a 10-propargil-10-desazaminopterina y otros inhibidores de folato de 15 líneas celulares de cáncer ensayadas;

La FIG. 3 muestra las CI_{50} para células DU-145, no expuestas previamente, adaptadas a 10-propargil-10-desazaminopterina (DU-PDX), y adaptadas a metotrexato (DU-MTX), cuando se tratan con 10-propargil-10-desazaminopterina metotrexato;

La FIG. 4 muestra las CI_{50} para células HEP2, no expuestas previamente, adaptadas a 10-propargil-10-desazaminopterina (HEP-PDX), y adaptadas a metotrexato (HEP-MTX), cuando se tratan con 10-propargil-10-desazaminopterina metotrexato;

La FIG. 5 muestra la expresión relativa de ARNm de genes de folato en líneas celulares resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina;

La FIG. 6 muestra una transferencia de Western de proteína DHFR en las líneas celulares DU145 y HEP2 sensibles y DU-PDX, DU-MTX, HEP-PDX y HEP-MTX resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina y a metotrexato;

La FIG. 7 muestra la expresión de ARNm para DHFR en líneas celulares DU145 y HEP2 sensibles y DU-PDX, DU-MTX, HEP-PDX y HEP-MTX resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina y a metotrexato.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Uno de los problemas continuos en la terapia de pacientes con cáncer se encuentra en las diferencias individuales en la respuesta a terapias y los cambios genéticos en los tumores, que dan lugar a resistencia a la quimioterapia. La quimioterapia implica la administración de fármacos a menudo dirigidos contra células que se dividen rápidamente. Muchos fármacos quimioterapéuticos interfieren con la replicación del ADN antes de la división celular, incluyendo los antifolatos. Aunque ha habido muchos avances en los agentes quimioterapéuticos, la inestabilidad genética de

las células cancerosas, especialmente de cánceres avanzados, da lugar a una gran incidencia de cánceres resistentes a fármacos.

En la presente invención, se desarrollaron líneas celulares con resistencia adquirida a metotrexato y a 10-propargil-10-desazaminopterina a partir de las líneas celulares de cáncer DU145 (de próstata) y HEP2 (de cabeza y cuello). Teniendo una resistencia más de 200 veces mayor a 10-propargil-10-desazaminopterina que las células parentales, las células DU-PDX y HEP-PDX con resistencia adquirida a 10-propargil-10-desazaminopterina mostraron resistencia cruzada al metotrexato; Las células DU-MTX y HEP-MTX aún mostraron una sensibilidad significativa a la 10-propargil-10-desazaminopterina.

Se observaron diferentes mecanismos de resistencia adquirida a la 10-propargil-10-desazaminopterina y al metotrexato. La resistencia adquirida a la 10-propargil-10-desazaminopterina se asoció con disminuciones significativas en la expresión de ARNm de RFC1 en las líneas celulares tanto DU-PDX como HEP-PDX, además, también se observaron disminuciones menores en la expresión de ARNm de MDR1. La presente invención también muestra una ligera disminución en la expresión de ARNm de FPGS en células resistentes a la 10-propargil-10-desazaminopterina, lo que sugiere un papel de la poliglutamación en la resistencia a la 10-propargil-10-desazaminopterina. Los estudios llevados a cabo hace tres décadas descubrieron que un mecanismo frecuente de resistencia adquirida a metotrexato es la amplificación del gen de DHFR y la consiguiente sobreexpresión de la enzima (revisado por Assaraf 2007; Chen et al., 1995). De este modo, tras la selección de líneas celulares tumorales cultivadas en concentraciones progresivamente en aumento de metotrexato, la resistencia adquirida a antifolato se debe frecuentemente a la amplificación del gen de DHFR. De hecho, en la presente invención, la línea celular HEP-MTX, con resistencia adquirida al metotrexato, mostró un aumento dramático en la expresión de proteína DHFR en comparación con su homólogo parental, lo que sugiere una posible amplificación del gen de DHFR en este modelo. Dicho aumento de proteína no se observó en las líneas celulares resistentes a la 10-propargil-10-desazaminopterina. Estos descubrimientos sugieren diferentes mecanismos moleculares de resistencia al metotrexato y a la 10-propargil-10-desazaminopterina en estas líneas celulares.

Un cáncer “responde” a un agente terapéutico o hay una “buena respuesta” a un tratamiento si su velocidad de crecimiento se inhibe como resultado del contacto con el agente terapéutico, en comparación con su crecimiento en ausencia de contacto con el agente terapéutico. El crecimiento de un cáncer puede medirse de diversos modos, por ejemplo, pueden medirse el tamaño de un tumor o la expresión de marcadores tumorales adecuados para ese tipo de tumor. Estos criterios definen el tipo de respuesta medida y también la caracterización del tiempo hasta la progresión de la enfermedad, que es otra medida importante de la sensibilidad de un tumor a un agente terapéutico. La cualidad de responder a 10-propargil-10-desazaminopterina es una cualidad variable, mostrando diferentes cánceres diferentes niveles de “respuesta” a un agente terapéutico dado, en diferentes condiciones. Además, las medidas de la respuesta pueden evaluarse usando criterios adicionales, más allá del tamaño de crecimiento de un tumor, incluyendo la calidad de vida del paciente, el grado de metástasis, etc. Además, pueden evaluarse marcadores y variables pronósticas clínicas en situaciones adecuadas.

Un cáncer “no responde” o tiene una “mala respuesta” a un agente terapéutico, tal como 10-propargil-10-desazaminopterina o hay una respuesta mala a un tratamiento si su velocidad de crecimiento no se inhibe, o se inhibe en muy poca medida, como resultado del contacto con el agente terapéutico cuando se compara con su crecimiento en ausencia de contacto con el agente terapéutico. Tal como se afirma anteriormente, el crecimiento de un cáncer puede medirse de diversos modos, por ejemplo, pueden medirse el tamaño de un tumor o la expresión de marcadores tumorales adecuados para ese tipo de tumor. La cualidad de no responder a un agente terapéutico es muy variable, mostrando diferentes cánceres diferentes niveles de “no respuesta” a un agente terapéutico dado, en diferentes condiciones. Además, las medidas de la no-respuesta pueden evaluarse usando criterios adicionales, más allá del tamaño de crecimiento de un tumor, incluyendo la calidad de vida del paciente, el grado de metástasis, etc. Además, pueden evaluarse marcadores y variables pronósticas clínicas en situaciones adecuadas. Dichos cánceres que no responden o que responden poco pueden ser de no respuesta o haber respondido inicialmente, pero haber desarrollado resistencia. La resistencia o no respuesta puede medirse frente a otros cánceres o líneas celulares tumorales más sensibles, o contra el mismo tipo de cáncer o líneas celulares tumorales. Estos tipos de cánceres también pueden citarse como cánceres “resistentes” a un agente quimioterapéutico particular, tal como, por ejemplo, un cáncer resistente a metotrexato puede ser originalmente resistente a metotrexato, o puede tener resistencia adquirida al metotrexato durante un ciclo o serie de ciclos de tratamiento con metotrexato u otro agente quimioterapéutico. La resistencia puede deberse a una mutación o mutaciones en proteínas en una de las proteínas de la ruta del folato, una ruta de importación de folato, o por cualquier otra proteína relevante para una respuesta a metotrexato.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención incluye un método para tratar un trastorno resistente a metotrexato en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de 10-propargil-10-desazaminopterina, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La capacidad de los tumores para adquirir resistencia a los efectos de fármacos que eran previamente tóxicos para estos puede dar lugar a resistencia. Dicha resistencia adquirida puede ser el resultado de una rotura cromosómica. La permeabilidad reducida es una forma común de resistencia intrínseca. La alteración o inactivación del fármaco es

quizá el mecanismo más común de resistencia a fármacos. La resistencia a fármacos también puede ser el resultado de un cambio en el sitio diana sobre el que actúa. Las situaciones en las que un trastorno, tal como un cáncer, ha adquirido resistencia al metotrexato pueden determinarse mediante evaluación por parte de los médicos tratantes u otros expertos en la materia, e incluyen la regresión o estasis del trastorno tras el tratamiento, seguida de la progresión del trastorno tras un periodo de tiempo de tratamiento determinado. Se ha observado que en muchos trastornos, incluyendo cánceres, que muchos trastornos manifiestan resistencia adquirida al tratamiento.

Por lo tanto, en otra realización, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad o neoplasia dependiente de la ruta del folato que ha adquirido resistencia al metotrexato durante el tratamiento con metotrexato, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende 10-propargil-10-desazaminopterina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

El "tratamiento" puede significar el uso de una terapia para prevenir o inhibir el crecimiento tumoral adicional, así como para provocar la disminución de un tumor, y para proporcionar tiempos de supervivencia mayores. El tratamiento también pretende incluir la prevención de la metástasis de un tumor. Un tumor se "inhibe" o "trata" si se alivia, termina, frena, minimiza o previene al menos un síntoma (según se determina mediante respuesta/no respuesta, tiempo hasta progresión, o indicadores conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) del cáncer. Cualquier mejora de cualquier síntoma, ya sea físico u otro, de un tumor después de tratamiento usando un régimen terapéutico (por ejemplo, 10-propargil-10-desazaminopterina) tal como se describe adicionalmente en el presente documento, se encuentra dentro del alcance de la invención. En general, por lo tanto, los términos "tratamiento", "que trata" y "tratar", tal como se usan en el presente documento, significan aliviar los síntomas, eliminar la causa del cáncer o un trastorno inflamatorio de forma temporal o permanente, frenar la aparición de síntomas y/o progresión del trastorno, o evitar la enfermedad (es decir, tratar profilácticamente). Un sujeto que recibe tratamiento profiláctico es generalmente un mamífero en riesgo de desarrollar un cáncer o una afección inflamatoria debida, por ejemplo, a predisposición genética, la dieta, exposición a agentes causantes del trastorno, exposición a agentes patógenos, y similares.

En una realización de la invención, las composiciones usadas para los métodos de la presente invención pueden incluir 10-propargil-10-desazaminopterina, incluyendo 10-propargil-10-desazaminopterina "altamente purificada", y diastereómeros de 10-propargil-10-desazaminopterina. Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones del presente documento, las composiciones que están "altamente purificadas" contienen 10-propargil-10-desazaminopterina sustancialmente libre de otros derivados de ácido fólico, particularmente de 10-desazaaminopterina, que puede interferir con la actividad antitumoral de la 10-propargil-10-desazaminopterina. Una composición dentro del alcance de la invención puede incluir vehículos o excipientes para formular la 10-propargil-10-desazaminopterina en una forma de dosis unitaria adecuada para uso terapéutico, así como agentes terapéuticos adicionales, no de folato.

La 10-propargil-10-desazaminopterina contiene centros asimétricos en la posición del carbono 10 (C10) y del carbono 19 (C19). En una realización, la 10-propargil-10-desazaminopterina incluye una mezcla racémica de aproximadamente 1:1 de las configuraciones *R* y *S* en el centro quiral C10, y $\geq 98,0\%$ del diastereómero *S* en el centro quiral de C19. La 10-propargil-10-desazaminopterina incluye los diastereómeros de C10 PDX-10a [configuración *S*] Nombre químico: ácido (2*S*)-2-[[4-[(1*S*)-1-[(2,4-diaminopteridin-6-*il*)metil]but-3-*inil*]benzoil]amino]pentanodioico, y PDX-10b [configuración *R*] Nombre químico: ácido (2*S*)-2-[[4-[(1*R*)-1-[(2,4-diaminopteridin-6-*il*)metil]but-3-*inil*]benzoil]amino]pentanodioico.

La 10-propargil-10-desazaminopterina puede sintetizarse usando el método divulgado en el Ejemplo 7 de DeGraw et al., Patente de Estados Unidos N° 5.354.751, que se refiere a la fabricación de 10-propargil-10-desazaminopterina, y que se incorpora en su totalidad al presente documento por referencia. La 10-propargil-10-desazaminopterina también puede sintetizarse mediante los métodos presentados en la Patente de Estados Unidos N° 6.028.071, especialmente en el Ejemplo 1, que se incorpora al presente documento por referencia.

Para generar diastereómeros de 10-propargil-10-desazaminopterina, la 10-propargil-10-desazaminopterina puede sintetizarse tal como se enseña en el presente documento y en otras partes, y bien el producto final o un producto intermedio anterior pueden usarse posteriormente como material de partida para separar los diastereómeros de C10. Como alternativa, puede emplearse una síntesis quiral en la que se producen PDX-10a y/o PDX-10b sustancialmente puros a partir de cualquiera de una serie de materiales de partida. Pueden emplearse columnas quirales para separar enantiómeros o diastereómeros, conocidas en la técnica, para separar los diastereómeros de la 10-propargil-10-desazaminopterina final o de un intermedio anterior. Las columnas quirales adecuadas para separar los diastereómeros incluyen la columna quiral CHIRALPAK AD, disponible a través de Daicel Chemical Industries Ltd., Japón, usando etanol como fase móvil.

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la ruta de folato es un cáncer. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno dependiente de la ruta de folato es un trastorno inflamatorio. En algunas realizaciones, el cáncer o el trastorno inflamatorio es un trastorno que era sensible inicialmente al metotrexato, al menos hasta cierto punto, y después adquirió resistencia al metotrexato. Los métodos para determinar si una enfermedad o trastorno de la ruta de folato tiene resistencia, ya sea intrínseca o adquirida, al metotrexato pueden

determinarse por un experto en la materia, y puede incluir métodos, tales como cultivar o adquirir células relevantes, tales como células tumorales del paciente y determinar el nivel de expresión de varias enzimas de la ruta del folato asociadas con la resistencia y/o sensibilidad al metotrexato. Otro de dichos métodos es determinando y/o controlando la respuesta del paciente al tratamiento con metotrexato para revelar resistencia, ya sea inherente o adquirida. Las células relevantes pueden bien genotiparse o fenotiparse para determinar la expresión relativa de marcadores que indican la resistencia al metotrexato.

En una realización, un ensayo fenotípico para su uso en la invención comprende obtener un explante tumoral de un paciente, cultivar porciones del explante, crecer una monocapa de células relevantes del explante, y exponer la monocapa a un candidato a fármaco, y evaluar la capacidad del candidato a fármaco para alterar el fenotipo de la célula tumoral.

El análisis genotípico de acuerdo con la invención se logra mediante cualquier método conocido. Un método preferido comprende comparar el genotipo, o una porción del mismo, de células obtenidas del paciente con genotipos conocidos por estar asociados con la resistencia a fármacos generalmente, o específicamente respecto a un candidato terapéutico que se esté evaluando. Por ejemplo, la existencia en las células de un paciente de una variante polimórfica que se sabe o se sospecha que confiere resistencia a un candidato terapéutico podría descartar a ese candidato como un agente terapéutico potencial contra esas células. Las características genéticas de las células de un paciente se determinan mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, secuenciación, polimorfismos) tal como se exponen a continuación. El impacto del genotipo de un paciente en la resistencia a fármacos puede determinarse mediante referencia a las bases de datos genéticas o bibliotecas que catalogan mutaciones conocidas o polimorfismos relacionados con la resistencia.

Aun no deseando quedar ligados a cualquier mecanismo, los ejemplos de mutaciones en las células que se asocian con la resistencia o la resistencia adquirida al metotrexato incluyen, pero sin limitación, aumentos en el ARNm y/o expresión de proteínas de DHFR en relación a células sensibles o en relación a las células antes de adquirir resistencia.

En algunas realizaciones, el cáncer o la enfermedad inflamatoria tienen resistencia adquirida al metotrexato. Los cánceres a tratar incluyen, por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, y linfoma de células T. Para el linfoma de células T, existe una variedad de afecciones objeto de tratamiento usando los diastereómeros de la invención, e incluyen: (a) linfomas linfoblásticos en los que la neoplasia aparece en progenitores linfoides primitivos del timo; (b) neoplasias de células T maduras o periféricas, incluyendo leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T, leucemia de células NK agresiva, linfomas cutáneos de células T (micosis fungoide/síndrome de Sezary), linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células T de tipo enteropático, leucemia/linfoma de células T de adulto incluyendo aquellos asociados con HTLV-1, y linfoma de células T angioinmunoblástico, y linfoma de células T paniculíticas subcutáneo; y (c) linfomas de células T periféricos que implican inicialmente al paracórtex de un nódulo linfático y nunca crecen en un patrón auténticamente folicular. Otros cánceres a tratar incluyen neoplasias hematológicas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tracto gastrointestinal, cáncer de ovario, y osteosarcoma.

La expresión "trastorno inflamatorio", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier trastorno que o bien está causado por inflamación o cuyos síntomas incluyen inflamación. A modo de ejemplo, un trastorno inflamatorio causado por la inflamación puede ser choque séptico, y un trastorno inflamatorio cuyos síntomas incluyen inflamación puede ser artritis reumatoide. Los trastornos inflamatorios de la presente invención incluyen, pero sin limitación: enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, choque séptico, enfermedad de injerto contra hospedador, asma, rinitis, psoriasis, y eccema. En una realización, un trastorno inflamatorio a tratar incluye artritis reumatoide y artritis reumatoide juvenil.

El término "paciente" o "mamífero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales doméstico y de granja, y animales de zoo o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, ganado, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

La 10-propargil-10-desazaminopterina para su uso de acuerdo con la presente invención se administrará típicamente al paciente en un régimen de dosificación que proporcione el tratamiento más eficaz (desde las perspectivas tanto de eficacia como de seguridad) para el trastorno que se está tratando en el paciente, como se conoce en la técnica. Al llevar a cabo el método de tratamiento de la presente invención, la 10-propargil-10-desazaminopterina para su uso en un trastorno resistente a metotrexato y/o en un cáncer sensible a 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la presente invención puede administrarse de cualquier manera eficaz conocida en la técnica, tal como por vía oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, subcutánea, intranasal, intra-ocular, vaginal, rectal, intracraneal, o intradérmica, dependiendo del tipo de cáncer que se esté tratando, y del criterio médico del médico prescriptor basándose, por ejemplo, en los resultados de estudios clínicos publicados.

La 10-propargil-10-desazaminopterina para su uso en un trastorno resistente a metotrexato y/o un cáncer sensible a 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la presente invención puede formularse como parte de una

preparación farmacéutica. La forma de dosificación específica dependerá del método de administración, pero puede incluir comprimidos, cápsulas, líquidos orales, y soluciones inyectables para administración oral, intravenosa, intramuscular, intracraneal, o intraperitoneal, y similares. La dosificación puede expresarse como mg/m². Como alternativa, la dosificación puede expresarse como mg/kg de peso corporal mediante cualquier modo aceptable para un experto en la materia. Un método para obtener una dosificación equivalente en mg/kg de peso corporal implica aplicar el factor de conversión 0,025 mg/kg, para un ser humano medio, como aproximadamente equivalente a 1 mg/m². De acuerdo con este cálculo, una dosificación de 150 mg/m² es aproximadamente equivalente a aproximadamente 3,75 mg/kg.

La dosificación adecuada en oncología para el tratamiento de un trastorno resistente a metotrexato y/o un cáncer 10-propargil-10-desazaminopterina incluye los siguientes regímenes de dosificación. En una realización, estas dosificaciones son I.V. Por ejemplo, son adecuadas las dosis en el orden de 10 a 120 mg/m² de área superficial corporal/día (de aproximadamente 0,25 a 3 mg/kg de peso corporal por día). También son adecuadas dosificaciones de 30 mg/m² (aproximadamente 0,75 mg/kg) una vez a la semana durante 3 semanas seguido de una semana de descanso, 30 mg/m² (aproximadamente 0,75 mg/kg) una vez a la semana x 6 semanas seguido de una semana de descanso, o aumentar gradualmente las dosis de 10-propargil-10-desazaminopterina en la pauta de una vez a la semana x 6 semanas. Pueden usarse dosis menores según sea adecuado basándose en la tolerancia del paciente y en el tipo de neoplasia. Pueden usarse dosis más altas donde se usa una administración menos frecuente. Por lo tanto, en un sentido general, las dosis de 10 a 275 mg/m² (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 6,9 mg/kg) se usan de manera adecuada con diversas pautas de dosificación, por ejemplo, dosificaciones entre aproximadamente 100 a 275 mg/m² (de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 6,87 mg/kg) para dosificaciones bisemanales, y entre aproximadamente 10 a 150 mg/m² (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 3,75 mg/kg), o, más específicamente, entre aproximadamente 10 y 60 mg/m² para dosificaciones una vez a la semana.

La determinación de dosis adecuadas usando protocolos similares a los divulgados en la Patente de Estados Unidos N° 6.323.205 se encuentra dentro de las capacidades de la técnica. En una realización, la 10-propargil-10-desazaminopterina para su uso en un trastorno resistente a metotrexato y/o un cáncer sensible a 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la presente invención puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 275 mg/m² (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 6,87 mg/kg) por dosis. Los métodos de la presente invención también incluyen la administración de 10-propargil-10-desazaminopterina para su uso en un trastorno resistente a metotrexato y/o un cáncer sensible a 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la presente invención de manera semanal; en una dosis de aproximadamente 10 mg/m² (0,25 mg/kg) o de aproximadamente 30 mg/m² (0,75 mg/kg); en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 mg/m² (de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 3,75 mg/kg) por dosis; de manera bisemanal; y en una cantidad de dosificación de aproximadamente 100 a aproximadamente 275 mg/m² (de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 6,9 mg/kg). En una realización, 10-propargil-10-desazaminopterina para su uso en un trastorno resistente a metotrexato y/o un cáncer sensible a 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la presente invención puede administrarse en una cantidad de entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 4 mg/kg; entre aproximadamente 0,75 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg; en una cantidad de entre aproximadamente 1,0 mg/kg y aproximadamente 2,5 mg/kg; en una cantidad de aproximadamente 0,25 mg/kg o aproximadamente 0,75 mg/kg (o una cantidad en área de superficie corporal (BSA)).

La 10-propargil-10-desazaminopterina puede usarse en combinaciones con otros compuestos citotóxicos y antitumorales, incluyendo alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, navelbina, y vindesina, análogos de nucleótidos, tales como gemcitabina, 5-fluorouracilo, y citarabina; agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida o ifosfamida; cisplatino o carboplatino; leucovorina; taxanos, tales como paclitaxel o docetaxel; anticuerpos monoclonales anti-CD20, con o sin radioisótopos, y antibióticos, tales como doxorubicina y mitomicina. También pueden usarse combinaciones de 10-propargil-10-desazaminopterina con varios de estos otros agentes antitumorales o con inhibidores de factores de crecimiento o agentes antiangiogénicos.

La 10-propargil-10-desazaminopterina y otros agentes pueden administrarse concurrentemente o utilizarse en combinación como parte de un régimen de tratamiento común, en el que la 10-propargil-10-desazaminopterina y el otro o los otros agentes se administran en momentos diferentes. Por ejemplo, el otro agente puede administrarse antes, inmediatamente después o después de un periodo de tiempo (por ejemplo 24 horas) en relación a la administración de la 10-propargil-10-desazaminopterina. Por lo tanto, para los fines de la presente solicitud, el término administrar se refiere generalmente a la administración concurrente o a la administración secuencial de los fármacos en cualquier orden en un régimen de tratamiento paralelo o sin una separación en el tiempo entre fármacos, a menos que se especifique lo contrario.

Para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, la 10-propargil-10-desazaminopterina puede administrarse por vía oral, intramuscular, intravenosa, intraarterial o intratecal. Los expertos en la técnica encontrarán otras rutas adecuadas. Para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, incluyendo, sin limitación, psoriasis, artritis reumatoide, y/o artritis reumatoide juvenil, la dosificación puede incluir lo siguiente. Los métodos de la presente invención para la artritis reumatoide del adulto o la artritis reumatoide juvenil de curso poliarticular incluyen la administración oral de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 mg una vez a la semana; en una realización, se administran 7,5 mg una vez a la semana. Otras dosificaciones pueden incluir 10 mg/m² administrados una vez a la semana. Las

dosificaciones pueden ajustarse gradualmente para lograr una respuesta óptima. A dosis mayores, tales como por encima de 20 mg/m²/semana, o de 0,65 a 1,0 mg/kg/semana, puede lograrse una mejor absorción mediante dosificaciones intramusculares o subcutáneas. La dosificación adecuada también puede incluir 7,5 mg por semana, o dosis orales divididas de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 mg; en una realización, la dosificación puede ser una dosis oral dividida de 2,5 mg a intervalos de 12 horas durante tres dosis, administrado en forma de un ciclo una vez a la semana. La dosificación puede continuarse durante tanto tiempo como sea eficaz, e incluye terapia durante hasta dos años y más prolongadas.

La 10-propargil-10-desazaminopterina se usa de manera adecuada en combinación con suplementación de ácido fólico y vitamina B 12 para reducir los efectos secundarios del tratamiento. Por ejemplo, puede tratarse a los pacientes con ácido fólico (1 mg/m² una vez al día comenzando una semana antes del tratamiento con la 10-propargil-10-desazaminopterina, o como alternativa 1 mg perioral (p.o.) a diario sin basarse en el área superficial corporal (BSA)); y B12 (1 mg/m² mensualmente, o como alternativa administrándose 1 mg intramuscularmente (I.M.) cada 8-10 semanas (no basándose en la BSA), o como alternativa 1 mg p.o. a diario (no basándose en la BSA)).

En una realización, la 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la invención se formula para administración oral. En otra realización, la 10-propargil-10-desazaminopterina de acuerdo con la invención se formula para administración intravenosa.

La 10-propargil-10-desazaminopterina puede administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación diferentes. Por ejemplo, la 10-propargil-10-desazaminopterina puede administrarse preferentemente por vía oral o parenteral.

La 10-propargil-10-desazaminopterina puede administrarse con varios vehículos inertes farmacéuticamente aceptables en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, trociscos, caramelos duros, polvos, pulverizadores, cremas, salvas, supositorios, gelatinas, geles, pastas, lociones, pomadas, elixires, jarabes, y similares. La administración de dichas formas de dosificación puede llevarse a cabo en dosis individuales o múltiples. Los vehículos incluyen diluyentes sólidos o cargas, medio acuoso estéril y varios disolventes orgánicos no tóxicos, y otros. Las composiciones farmacéuticas orales pueden endulzarse y/o aromatizarse de manera adecuada. Para la administración oral de la 10-propargil-10-desazaminopterina, se combinan comprimidos que contienen uno o ambos de los agentes activos con cualquiera de diversos excipientes, tales como, por ejemplo, celulosa microcristalina, citrato de sodio, carbonato cálcico, fosfato dicálcico y glicina, junto con varios disgregantes, tales como almidón (y preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), ácido alginico y determinados silicatos complejos, junto con aglutinantes de granulación, tales como polivinil pirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, a menudo son muy útiles agentes lubricantes como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco para preparar comprimidos. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina; los materiales preferidos a este respecto también incluyen lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de elevado peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para administración oral, la 10-propargil-10-desazaminopterina puede combinarse con varios agentes edulcorantes o aromatizantes, materiales colorantes o tintes, y, si se desea, también agentes emulsionantes y/o suspensores, junto con diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y varias combinaciones similares de los mismos. Puede prepararse un comprimido que contiene la composición de la presente invención mediante compresión o moldeado, de manera opcional con uno o más ingredientes o adyuvantes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo, en una máquina adecuada, el principio activo en una forma de flujo libre, tal como polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeables pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo mojado con un diluyente líquido inerte. Cada comprimido contiene preferentemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 g del principio activo y cada sello o cápsula contiene preferentemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 g del principio activo; los comprimidos también pueden contener de manera adecuada aproximadamente 2,5 mg de principio activo por cápsula o aproximadamente 7,5 mg por cápsula.

Para la administración parenteral de la 10-propargil-10-desazaminopterina, pueden emplearse soluciones, así como soluciones acuosas estériles que comprenden al principio activo o una sal correspondiente soluble en agua del mismo. Dichas soluciones acuosas estériles están preferentemente tamponadas, aunque también se pueden hacer isotónicas, por ejemplo, con suficiente suero salino o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para inyección por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Las soluciones oleosas son adecuadas para inyección por vía intraarticular, intramuscular y subcutánea. La preparación de todas estas soluciones en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas para los expertos en la materia.

Para fines veterinarios, los principios activos pueden administrarse por separado o juntos a animales usando cualquiera de las formas y mediante cualquiera de las rutas descritas anteriormente. En una realización preferida, la 10-propargil-10-desazaminopterina se administra en forma de cápsula, bolo, comprimido, dosificación líquida forzada, mediante inyección o como un implante. Como alternativa, la 10-propargil-10-desazaminopterina puede administrarse con la comida del animal, y con este fin puede prepararse un aditivo alimentario concentrado o

premezcla para la comida normal del animal. Dichas formulaciones se preparan de manera convencional de acuerdo con la práctica veterinaria convencional.

La presente invención también incluye un método para tratar a un individuo que necesite tratamiento para una neoplasia resistente al metotrexato, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de 10-propargil-10-desazaminopterina, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Cuando un compuesto de la presente invención es ácido, su sal correspondiente puede prepararse de manera conveniente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de dichas bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre (cúpricas y cuprosas), férricas, ferrosas, de litio, magnesio, manganeso (mangánicas y manganosas), de potasio, sodio, zinc y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. En una realización, la sal es la sal de clorhidrato. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, así como aminas cíclicas y aminas sustituidas, tales como aminas sustituidas de origen natural y sintetizadas. Otras bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables a partir de las que pueden formarse sales incluyen resinas de intercambio iónico, tales como, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N',N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripopilamina, trometamina y similares.

Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, la 10-propargil-10-desazaminopterina (incluyendo sales, ésteres, solvatos, y polimorfos farmacéuticamente aceptables de cada componente de la misma) también pueden administrarse por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, dimensiones, condiciones de reacción y similares usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

En esta solicitud y en las reivindicaciones, el uso del singular incluye el uso del plural, a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso de la expresión "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluyó", no es limitante. También, los términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una unidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

La invención se basa en parte en datos que muestran que las células con resistencia adquirida al metotrexato seguirán teniendo sensibilidad al pralatrexato, mientras que las células que hayan adquirido resistencia al pralatrexato también tendrán resistencia al metotrexato. En referencia a los factores genéticos predictivos de sensibilidad al pralatrexato, se desarrollaron dos líneas celulares con resistencia adquirida al fármaco a partir de las líneas celulares de cáncer DU145 (próstata) y HEP2 (cabeza y cuello). Al ser más de 200 veces más resistentes al pralatrexato que las células parentales, DU-PDX y HEP-PDX mostraron resistencia cruzada parcial al metotrexato. La resistencia adquirida al pralatrexato se asoció con la expresión disminuida de RFC-1 y con la expresión aumentada de MDR1. Fotoohi et al (2009) describieron líneas de leucemia resistentes a antifolato con niveles de ARNm de RFC-1 regulados negativamente en más del doble en células resistentes al metotrexato, haciendo énfasis en el importante papel del transporte de entrada en la resistencia al antifolato. Anteriormente se obtuvieron resultados similares por Jansen (1998), Rothen (2004), e Ifergan (2003) usando otros modelos celulares resistentes al metotrexato. La expresión aumentada de MDR1 no parece tener un papel en la resistencia adquirida observada al pralatrexato, ya que la inhibición de MDR1 no restauró la sensibilidad al pralatrexato. Se demostró que la actividad de FPGS disminuida está asociada con la resistencia adquirida al metotrexato en las células CCRF-CEM de leucemia humana (Mauritz, 2002). En un estudio, se observó una ligera disminución en la expresión de FPGS en células resistentes al pralatrexato, lo que sugiere un papel de la poliglutamación en la resistencia al pralatrexato. Los estudios llevados a cabo hace tres décadas descubrieron que otro mecanismo frecuente de resistencia adquirida a metotrexato es la amplificación del gen de DHFR y la consiguiente sobreexpresión de la enzima (revisado por Assaraf 2007; Chen et al., 1995). En este estudio, la línea celular HEP-MTX, con resistencia adquirida al metotrexato, mostró un aumento dramático en la expresión de ARNm y proteína de DHFR en comparación con su homólogo parental. No se observó expresión aumentada de DHFR en las líneas celulares resistentes a pralatrexato. Estos descubrimientos sugieren diferentes mecanismos moleculares de resistencia al metotrexato y a pralatrexato en estas líneas celulares.

Por lo tanto, la presente invención demuestra que sorprendentemente, las líneas celulares que se hacen resistentes al metotrexato no se hicieron resistentes al pralatrexato y/o mantuvieron mucha más de la sensibilidad original al pralatrexato.

Los objetos adicionales, ventajas, y nuevas características de la presente invención serán evidentes para un experto en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se delinean anteriormente en el presente documento y tal como se reivindican en el capítulo reivindicatorio más adelante se encuentra apoyado experimentalmente en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1:

La FIG. 1 muestra un esquema sintético útil para preparar 10-propargil-10-desazaminopterina. Una mezcla de NaH al 60% en dispersión oleosa (1,06 g, 26,5 mmol) en 18 ml de THF secado por tamizado se enfrió hasta 0 °C. La mezcla fría se trató con una solución de dimetil éster de ácido homotereftálico (5,0 g, 24 mmol, compuesto 1 en la FIG. 1) en THF seco (7 ml), y la mezcla se agitó durante 1 hora a 0 °C. Se añadió bromuro de propargilo (26,4 mmol), y la mezcla se agitó a 0,0 °C durante 1 hora adicional, y después a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla resultante se trató entonces con 2,4 ml de ácido acético al 50 % y después se vertió en 240 ml de agua. La mezcla se extrajo con éter (2 X 150 ml). Se combinaron los extractos de éter, se secaron sobre Na₂SO₄, y se concentraron hasta obtener un aceite de color naranja-amarillo. La cromatografía sobre gel de sílice (600 ml de malla 230-400) con elución mediante ciclohexano-EtOAc (8:1) dio el producto, dimetil éster del ácido α -propargilhomotereftálico (compuesto 2) en forma de un sólido de color blanco (4,66) que mediante TLC (ciclohexano-EtOAc, 3:1) parecía homogéneo. Los datos de espectros de masas de este producto, sin embargo, mostraron que era una mezcla del producto 2 deseado, y del compuesto dipropargilado. No se detectó material de partida 1. La HPLC muestra que la proporción de productos monopropargilados a dipropargilados es de aproximadamente 3:1. Ya que el producto dipropargilado, a diferencia del compuesto 1, no puede producir un coproducto no deseado en la siguiente etapa de la reacción, este material era adecuado para su conversión a compuesto 3. La ausencia de compuesto 1 de partida en el producto usado para llevar a cabo la síntesis es muy importante para evitar la formación secuencial de 10-dAM durante las transformaciones que dan lugar al producto final, debido a que la completa eliminación de 10-dAM de la 10-propargil-10-desazaminopterina es muy difícil.

Se formó una mezcla combinando 0,36 g de dispersión de NaH al 60 % NaH (9 mmol) en aceite con 10 ml de DMF seco y se enfrió hasta 0-5 °C. La mezcla fría se trató gota a gota con una solución del producto de la primera reacción (compuesto 2) (2,94 g, 12 mmol) en 10 ml de DMF seco y a continuación se agitó a 0 °C durante 30 minutos. Después de enfriar hasta -25 °C, se añadió una solución de bromhidrato de 2,4-diamino-6-(bromometil)-pteridina 0,2 y 2-propanol (1,00 g, 2,9 mmol) en 10 ml de DMF seco gota a gota mientras que se mantenía la temperatura próxima a -25 °C. Se dejó aumentar la temperatura de la solución agitada hasta -10 °C durante un periodo de 2 horas. Después de 2 horas adicionales a -10 °C, se dejó aumentar la temperatura hasta 20 °C, continuándose la agitación a temperatura ambiente durante 2 horas más. Entonces se ajustó la reacción a pH 7 añadiendo CO₂ sólido. Después de concentrar *al vacío* para eliminar el disolvente, se agitó el residuo con éter dietílico y se recogió el material no soluble en éter, se lavó con agua, y se secó *al vacío* para dar 1,49 g de un producto en bruto. Este producto en bruto se disolvió en CHCl₃-MeOH (10:1) para su aplicación a una columna de gel de sílice. La elución mediante el mismo sistema de disolvente produjo metil éster del ácido 10-propargil-10-carbometoxi-4-desoxi-4-amino-10-desazapteroico (compuesto 3) que fue homogéneo mediante TLC con un rendimiento del 40 % (485 mg).

Se trató una suspensión agitada de compuesto 3 (400 mg, 0,95 mmol) en 2-metoxietanol (5 ml) con agua (5 ml) y después con solución de hidróxido de sodio al 10 % (3,9 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, tiempo durante el cual sucedió la disolución. La solución se ajustó a pH 8 con ácido acético y se concentró a alto vacío. El residuo resultante de disolvió en 15 ml de agua se acidificó a pH 5,5-5,8 dando como resultado la formación de un precipitado. Se recogió el precipitado, se lavó con agua y se secó *al vacío* para recuperar 340 mg de compuesto 4 (rendimiento del 91 %). El análisis HPLC indicó una pureza del producto del 90 %.

El compuesto 4 (330 mg) se descarboxiló calentándolo en 15 ml de DMSO a 115-120 °C durante 10 minutos. Una prueba mediante HPLC después de 10 minutos confirmó que la conversión estaba esencialmente completa. El DMSO se retiró mediante destilación *al vacío* (baño a 40 °C). El residuo se agitó con NaOH 0,5 N para dar una solución transparente. La acidificación hasta pH 5,0 con HCl 1 N dio ácido 10-propargil-4-desoxi-4-amino-10-desazapteroico (compuesto 5) en forma de un sólido de color amarillo con un rendimiento del 70 %. La HPLC indicó que la pureza del producto en esta etapa era del 90 %.

El compuesto 5 (225 mg, 0,65 mmol) se acopló con clorhidrato de L-glutamato de dimetilo (137 mg, 0,65 mmol) usando reactivo BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (287 mg, 0,65 mmol, Aldrich Chemical Co.) en DMF (10 ml) que contenía trietilamina (148 mg, 1,46 mmol). La mezcla se agitó durante 3 horas a 20-25 °C y después se evaporó hasta sequedad. El residuo se agitó con agua, y el producto en bruto insoluble en agua se recogió y secó *al vacío*. El producto en bruto (350 mg) se purificó mediante cromatografía en gel de sílice

con elución con CHCl_3 -MeOH (10:1) que contenía trietilamina (0,25 % en volumen) para recuperar 165 mg de dimetil éster de 10-propargil-10-desazaminopterina (compuesto 6, rendimiento del 50 %) que fue homogéneo mediante TLC (CHCl_3 -MeOH 5:1).

El compuesto 6 (165 mg, 0,326 mmol) se suspendió en 10 ml de MeOH agitado al que se le añadieron 0,72 ml (0,72 mequiv) de NaOH 1 N. Se continuó agitando a temperatura ambiente hasta que tras unas horas se produjo la disolución. La solución se mantuvo a 20-25 °C durante 8 horas, después se diluyó con 10 ml de agua. La evaporación a presión reducida eliminó el metanol, y la solución acuosa concentrada se dejó a 20-25 °C durante otras 24 horas. La HPLC mostró entonces que la hidrólisis del éster estaba completa. La solución acuosa transparente se acidificó con ácido acético hasta pH 4,0 para precipitar la 10-propargil-10-desazaminopterina en forma de un sólido de color amarillo pálido. El producto recogido, lavado en agua y secado al vacío pesó 122 mg (rendimiento del 79 %). Los ensayos mediante análisis elemental, RMN de protones y espectrometría de masas fueron completamente coherentes con la estructura asignada. El análisis mediante HPLC indicó una pureza del 98 % y estableció que el producto estaba libre de 10-desazaaminopterina.

En este caso, la cantidad de 10-propargil-10-desazaminopterina (determinada mediante el área del pico de la HPLC) se aproxima al 98 %, y el pico correspondiente al 10-desazaaminopterina no se detecta por el programa informático de procesamiento, aunque hay una elevación basal menor en esta zona.

Ejemplo 2:

Para explorar la actividad de la 10-propargil-10-desazaminopterina a lo largo de diferentes tipos tumorales sólidos, se investigaron 15 líneas celulares de tumores sólidos humanos para su sensibilidad a la actividad citotóxica de la 10-propargil-10-desazaminopterina.

Materiales y métodos: Líneas celulares

Se adquirió un panel de líneas celulares de cáncer de colon (HT29, HCT116, COLO205, HCC2998), de mama (MCF7, MDA-MB-435), de pulmón (HOP62, HOP92), de ovario (OVCAR3, IGROV1), de próstata (DU145, PC3), y de cabeza y cuello (SCC61, HEP2, SQ20B) humanas a través de la ATCC (Rockville, MD) y de las colecciones del National Cancer Institute. Las células se crecieron como monocapas en medio RPMI suplementado con suero fetal de ternero al 10 %, glutamina 2 mM, 100 unidades ml^{-1} de penicilina y 100 μM ml^{-1} de estreptomycin.

Ensayos de citotoxicidad celular

Todos los datos generados fueron el resultado de tres experimentos realizados por duplicado. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo MTT, que se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente (Hansen, 1989). En resumen, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^3 células pocillo⁻¹. Las células se incubaron durante 120 horas y después se añadieron 0,4 mg ml^{-1} de colorante MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-dimetiltetrazolio) durante 4 horas a 37 °C. La monocapa se suspendió en 0,1 ml de DMSO y se midió la absorbancia a 560 nm usando un lector de microplacas. Los controles positivos y negativos incluyeron pocillos con células no tratadas o medio que contenía MTT sin células, respectivamente. La conversión de MTT de tetrazolio soluble en agua de color amarillo en formazán insoluble de color púrpura está catalizada por las deshidrogenasas mitocondriales y se usa para estimar el número de células viables. El valor de control correspondiente a las células no tratadas se tomó como un 100 % y la viabilidad de las muestras tratadas se expresó como porcentaje del control. Los valores de CI_{50} se determinaron como concentraciones que redujeron la viabilidad celular en un 50 %.

Para los estudios con un solo agente, se sembraron las células y se dejaron reposar durante 24 horas antes del tratamiento con concentraciones en aumento de 10-propargil-10-desazaminopterina durante 72 h. Después de la incubación, se dejó que las células se recuperasen en medio libre de compuesto durante 48 h, antes de la determinación de la inhibición del crecimiento usando el ensayo MTT.

Análisis de transferencia de Western

Las células se lisaron en tampón que contenía HEPES 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, vanadato de sodio 2 mM, NaF 100 mM, y 0,4 mg. ml^{-1} de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Se sometió a cantidades iguales de proteína (20-50 μg /carril) a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se sondaron con anticuerpos primarios específicos anti-PARP escindido, anti-caspasa 3 escindida, anti-caspasa 9 (Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France), anti-DHFR (Abcam, France), anti- β -actina (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) seguido de anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa y visualización mediante quimioluminiscencia.

La Figura 2 muestra la sensibilidad relativa a 10-propargil-10-desazaminopterina de las 15 líneas celulares de cáncer humanas ensayadas. Se observó que nueve de las líneas celulares eran sensibles a la actividad citotóxica de la 10-

propargil-10-desazaminopterina ($CI_{50} < 0,1 \mu M$), mientras que se observó que 6 líneas celulares eran relativamente resistentes ($CI_{50} > 9 \mu M$).

Efectos antiproliferativos de un solo agente

Los efectos antiproliferativos del pralatrexato se examinaron en 15 líneas celulares de cáncer tal como se muestran en la Tabla 1. Los experimentos de lapso de tiempo demostraron que se lograban efectos antiproliferativos óptimos cuando las células se exponían a pralatrexato durante 72 h (Figura 1A). Las CI_{50} del pralatrexato se encontraron en el intervalo de $0,01 \pm 0,002 \mu M$ para la línea celular de cáncer de próstata PC3 hasta $>350 \mu M$ para la línea celular MDA-MB-435. Interesantemente, se observaron dos grupos de líneas celulares con una diferencia de más de 100 veces en la CI_{50} : Un grupo que incluía células PC3, se expuso a células SCC61, se expuso a células DU145, se expuso a células HT29, se expuso a células HOP62, se expuso a células SQ20B, se expuso a células HOP92, se expuso a células HEP2, e IGROV1 mostraron valores de $CI_{50} < 0,1 \mu M$, mientras que las células Colo205, se expuso a células HCC2998, se expuso a células MCF7, se expuso a células HCT116, se expuso a células OVCAR3, y MDA-MB-435 mostraron valores de $CI_{50} \geq 9 \mu M$.

Los efectos antiproliferativos del pralatrexato se compararon con los del metotrexato y varios antimetabolitos usados comúnmente, tales como pemetrexed, se expuso a células 5-FU, y 5'-DFUR, el metabolito de capecitabina activo (Figura 1B y Tabla 1). Las CI_{50} de pralatrexato fueron de media al menos 10 veces menores que aquellas observadas para metotrexato. Los perfiles de citotoxicidad de estos dos antifolatos fueron similares con los mismos grupos distintos de líneas celulares sensibles y resistentes. El perfil de citotoxicidad del pralatrexato fue diferente del de 5-FU, 5'-DFUR, y pemetrexed, lo que sugiere diferencias en el metabolismo, el mecanismo de acción y/o la resistencia entre pralatrexato y estos otros antimetabolitos. Interesantemente, se observó sensibilidad cruzada limitante entre pralatrexato y pemetrexed, un antifolato que se cree que es principalmente un inhibidor de timidilato sintetasa (TS).

Expresión de genes implicados en el transporte de folato y en el metabolismo

Se analizó la expresión de genes conocidos por estar implicados en la sensibilidad a los antifolatos en el panel de líneas celulares de cáncer. Se analizó la expresión de ARNm de DHFR, FPGS, TS/TYMS, (timidilato sintetasa), SCL19A1/RFC-1, GARFT (glicinamida ribonucleótido formil transferasa), SLC25A32 (transportador/portador de folato mitocondrial), y de transportador ABC B1 (ABCB1 o MDR1) mediante qRT-PCR (Figura 3A). Las líneas celulares expresaron varios niveles de estos genes de la ruta de folato pero no se encontró una correlación significativa entre la sensibilidad a pralatrexato y la expresión de ARNm de TS, SCL19A1/RFC-1, GARFT, se expuso a células SLC25A32, y MDR1. Las células sensibles a pralatrexato expresaron niveles relativamente mayores de DHFR, una diana del pralatrexato, que el grupo "resistente", pero esto no alcanzó una diferencia estadística significativa ($p = 0,083$, Figura 3A). Las células sensibles a pralatrexato expresaron niveles significativamente mayores de ARNm de FPGS que las células resistentes (prueba de la t, $p = 0,002$). En su conjunto, se observó una tendencia hacia una correlación positiva entre expresión de ARNm de FPGS y sensibilidad a pralatrexato (CI_{50}) ($R^2 = 0,47$, $p < 0,01$), lo que sugiere un papel importante de la poliglutamación en la actividad antiproliferativa del pralatrexato.

Para determinar el papel potencial de los transportadores de folato en la actividad del pralatrexato, se correlacionaron los valores de CI_{50} obtenidos después de 72 h de exposición a fármaco con el nivel de expresión de ARNm en SCL19A1/RFC-1 y SLC25A32 en las nueve líneas celulares sensibles a pralatrexato (Figura 3B). Las células que expresaron un alto nivel de ARNm de SCL19A1/RFC-1 y SLC25A32 mostraron una mayor sensibilidad al pralatrexato, lo que sugiere papeles potenciales de SCL19A1/RFC-1 y SLC25A32 en la captación celular de pralatrexato.

Tabla 1. Citotoxicidad (CI_{50} , μM) después de 72 h de exposición a pralatrexato, metotrexato, se expuso a células 5-FU, 5'-DFUR o pemetrexed en un panel de líneas celulares de carcinoma humano.

Línea celular*	Pralatrexato	Metotrexato	Pemetrexed	5-FU	5'-DFUR
PC3	0,01	0,1	2,7	1,5	25
SCC61	0,011	0,03	0,015	1,2	3,2
DU145	0,015	0,3	0,048	7	28
HT29	0,02	0,22	0,023	3	16
HOP62	0,023	0,15	0,029	78	380
SQ20B	0,03	0,26	0,025	10	27
HOP92	0,031	0,6	0,02	18	135
HEP2	0,05	0,25	0,1	86	250
IGROV1	0,08	0,33	300	8	29
COLO205	9	30	0,024	0,8	3,9
HCC2998	100	> 350	1,5	10	34
MCF7	200	300	0,022	1,3	7,8

Línea celular*	Pralatrexato	Metotrexato	Pemetrexed	5-FU	5'-DFUR
HCT116	280	> 350	350	10	45
OVCAR3	> 350	> 350	0,025	31	230
MDA435	> 350	> 350	300	5	33

*Líneas celulares usadas: colon (HT29, se expuso a células HCT116, se expuso a células COLO205, HCC2998), mama (MCF7), melanoma (MDA-MB-435, anteriormente denominada como línea celular de cáncer de mama), NSCLC (HOP62, HOP92), ovario (OVCAR3, IGROV1), próstata (DU154, PC3) y cabeza y cuello (SCC61, se expuso a células HEP2, SQ20B)

Ejemplo 3:

Desarrollo de líneas celulares resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina y metotrexato.

Para caracterizar los factores predictivos de los efectos antiproliferativos de 10-propargil-10-desazaminopterina, las líneas celulares DU-PDX y HEP-PDX se desarrollaron a partir de células parentales DU145 Y HEP2, respectivamente, mediante exposición a concentraciones graduales en aumento de 10-propargil-10-desazaminopterina durante un periodo de 6 meses. Las células DU-PDX y HEP-PDX resultantes fueron al menos 200 y 500 veces menos sensibles a 10-propargil-10-desazaminopterina que las células parentales. Después de 5 pases en medio sin fármaco, las células resistentes mantuvieron su resistencia al fármaco, lo que sugiere la estabilidad de estas líneas celulares.

Para comparar los mecanismos de resistencia a 10-propargil-10-desazaminopterina y a metotrexato, se desarrollaron las líneas celulares DU-MTX y HEP-MTX a partir de células DU145 y HEP2 parentales mediante exposición a concentraciones graduales en aumento de metotrexato. DU-MTX y HEP-MTX mostraron resistencia a metotrexato y 10-propargil-10-desazaminopterina en comparación con células parentales. Sin embargo, la actividad de 10-propargil-10-desazaminopterina siguió siendo mayor (CI_{50} aproximadamente 10 veces menor) que la del metotrexato en células de cáncer DU-MTX y HEP-MTX.

La Figura 3 muestra la CI_{50} para 10-propargil-10-desazaminopterina o para metotrexato, para células DU145 y células DU145 adaptadas a 10-propargil-10-desazaminopterina o a metotrexato. Estos datos muestran que para DU-MTX, la 10-propargil-10-desazaminopterina retuvo una eficacia significativa; la CI_{50} para 10-propargil-10-desazaminopterina para las líneas celulares de DU-145 adaptadas a metotrexato era de 0,02 μ M. En comparación, la CI_{50} de 10-propargil-10-desazaminopterina para las células DU-145 no expuestas previamente era de 0,01 μ M. Las células DU-145 adaptadas a metotrexato mostraron un aumento de aproximadamente 10 veces en la CI_{50} para metotrexato. En resumen, las células DU-145 que se adaptaron a 10-propargil-10-desazaminopterina también se convirtieron en insensibles a metotrexato, mientras que las células DU-145 adaptadas a metotrexato todavía mostraron aproximadamente la misma sensibilidad a 10-propargil-10-desazaminopterina que las células DU-145 no expuestas previamente.

La Figura 4 muestra la CI_{50} para 10-propargil-10-desazaminopterina o para metotrexato, para células HEP2 y células HEP2 adaptadas a 10-propargil-10-desazaminopterina o a metotrexato. Estos datos muestran que para HEP-MTX (adaptadas a metotrexato), la 10-propargil-10-desazaminopterina retuvo una eficacia significativa; La 10-propargil-10-desazaminopterina todavía siguió siendo diez veces más eficaz según la medición de CI_{50} .

Cambios genéticos asociados con la resistencia adquirida a 10-propargil-10-desazaminopterina.

RT-PCR.

Los aspectos teóricos y prácticos de la RT-PCR cuantitativa usando el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) son conocidos por los expertos en la materia. Los resultados se expresaron como diferencias de n veces en la expresión del gen diana en relación al gen TBP (un control de ARN exógeno) y en relación a un calibrado (1 X muestra), que consiste en la muestra de línea celular de la serie ensayada que contenía la cantidad más pequeña de ARNm del gen diana. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Para determinar los posibles mecanismos de resistencia a antifolatos, se evaluó la expresión de ARNm de varios genes implicados en el metabolismo de los folatos, incluyendo DHFR, TS, FPGS, RFC1/SCL19A1, SLC25A32 y ABCB1/MDR1 en células parentales y resistentes. Tal como se muestra en la Figura 5, la expresión de ARNm de DHFR, TS, y SLC25A32 no cambió significativamente en las células resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina. Se observó una ligera disminución en la expresión de ARNm de FPGS en células DU-PDX y HEP-PDX en comparación con sus homólogos parentales. Por el contrario, la expresión de RFC1/SCL19A1 estaba disminuida en >10 veces en las dos líneas celulares resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina. Los niveles de ARNm de ABCB1/MDR1 fueron 40 y 2 veces mayores en DU-PDX y HEP-PDX, respectivamente, en comparación con DU145 y HEP2. Estos datos sugieren un papel importante de los transportadores en la actividad antiproliferativa

y la resistencia adquirida a 10-propargil-10-desazaminopterina. El verapamilo, un bloqueante de canales de calcio, revierte la resistencia funcionando como un sustrato competitivo de MDR1, independientemente de su función farmacológica innata. Varios estudios clínicos también demostraron que los fármacos, tales como el verapamilo pueden revertir la resistencia a fármacos anticáncer. Para estudiar el papel de MDR1 en la resistencia a 10-propargil-10-desazaminopterina, se incubaron células DU-PDX y HEP-PDX con verapamilo 30 μ M y ciclosporina A 3 μ M concomitantemente con 10-propargil-10-desazaminopterina durante 72 horas. No se observaron cambios en la citotoxicidad de 10-propargil-10-desazaminopterina con y sin verapamilo y ciclosporina A, lo que no sugiere un papel importante de la sobreexpresión de MDR1 en la resistencia adquirida en estas líneas celulares (resultados no mostrados).

El análisis de la expresión de DHFR, una diana de 10-propargil-10-desazaminopterina y metotrexato, mostró aumentos significativos de proteína en células HEP-MTX en comparación con células HEP2 parentales, lo que sugiere una posible amplificación génica (Figura 6) y un aumento significativo en el ARNm (Figura 7). La sobreexpresión de proteína DHFR aumentó ligeramente tras una exposición corta (24 horas) a 10-propargil-10-desazaminopterina, pero no después de una exposición prolongada (6 meses) a 10-propargil-10-desazaminopterina, lo que sugiere que el mecanismo molecular de resistencia adquirida a 10-propargil-10-desazaminopterina en células HEP-PDX es diferente al de resistencia a metotrexato en células HEP-MTX.

Para evaluar la resistencia cruzada de células resistentes a pralatrexato a otros fármacos, se expuso a células DU145, DU-PDX, HEP2 y HEP-PDX a pemetrexed y a 5-FU durante 72 h. No se observó una diferencia significativa entre células parentales y resistentes a PDX para la citotoxicidad de 5-FU. La exposición a pemetrexed durante 72 horas fue solo ligeramente menos citotóxica en células DU-PDX y HEP-PDX en comparación con sus homólogos parentales (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la resistencia adquirida al pralatrexato puede no traducirse en resistencia a pemetrexed y 5-FU, posiblemente debido a las diferencias en el mecanismo de acción de estos compuestos.

El pralatrexato es un antimetabolito con alta afinidad por la proteína de portador 1 de folato reducido (RFC-1) y folilpoliglutamato sintetasa (FPGS), dando como resultado una internalización y acumulación extensiva en células tumorales. Actualmente se está investigando el pralatrexato como agente único y en combinaciones en varias neoplasias. Para guiar el desarrollo clínico posterior, se necesitan correlaciones moleculares de sensibilidad a pralatrexato y datos preclínicos de tratamientos de combinación.

El pralatrexato mostró una actividad antiproliferativa potente ($CI_{50} < 0,1 \mu$ M) en nueve de 15 líneas celulares de tumores sólidos humanos. Se identificaron dos grupos distintos de líneas celulares con una diferencia de > 100 veces en los valores de CI_{50} de pralatrexato: líneas celulares sensibles y relativamente resistentes. Los efectos antiproliferativos *in vitro* del pralatrexato en cuanto a los valores de CI_{50} fueron de media prácticamente 10 veces mejores que aquellos observados con metotrexato. Cuando se compara la actividad citotóxica de estos dos antifolatos similares con otros antimetabolitos, incluyendo 5-FU, 5'-DFUR y pemetrexed, el pralatrexato parece mantener actividad en varias células que fueron poco sensibles a 5-FU y 5'-DFUR, tales como las líneas celulares NSCLC, HOP62 y HOP92. De manera similar, el perfil de sensibilidad a pemetrexed fue distinto del de pralatrexato, lo que puede explicarse por las diferencias en el mecanismo molecular de acción de estos compuestos.

En resumen, la resistencia adquirida a 10-propargil-10-desazaminopterina se asoció con una expresión disminuida de RFC-1 y aumentada de MDR1 en las líneas celulares DU-PDX y HEP-PDX. La inhibición farmacológica de MDR1 no cambió la resistencia a 10-propargil-10-desazaminopterina en estos modelos, lo que sugiere un papel limitado de MDR1 en la resistencia observada. No se encontró un cambio en la expresión de ARNm de DHFR en células resistentes a 10-propargil-10-desazaminopterina. Por el contrario, se observaron aumentos significativos en ARNm y expresión proteica de DHFR en células HEP-MTX. Se observaron diferencias en los mecanismos de resistencia adquirida a 10-propargil-10-desazaminopterina y a metotrexato; estos datos sugieren un desarrollo posterior de 10-propargil-10-desazaminopterina en cánceres sensibles a metotrexato así como en situaciones de resistencia adquirida a metotrexato.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de 10-propargil-10-desazaminopterina o sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de un trastorno resistente a metotrexato en un individuo que tiene un trastorno resistente a metotrexato, en el que el trastorno resistente a metotrexato es un trastorno con resistencia adquirida a metotrexato.
2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el trastorno es un cáncer.
- 10 3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el cáncer es cáncer de próstata, linfoma de células T, cáncer de mama, cáncer de pulmón, neoplasias hematológicas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tracto gastrointestinal, cáncer de ovario, y osteosarcoma.
- 15 4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno es un trastorno inflamatorio.
5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el trastorno inflamatorio es artritis reumatoide.
- 20 6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno es una neoplasia.
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la neoplasia es cáncer de próstata, linfoma de células T, cáncer de mama, cáncer de pulmón, neoplasias hematológicas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del tracto gastrointestinal, cáncer de ovario, y osteosarcoma.
- 25 8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha composición se formula para administración oral.
- 30 9. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha composición se formula para administración intravenosa.

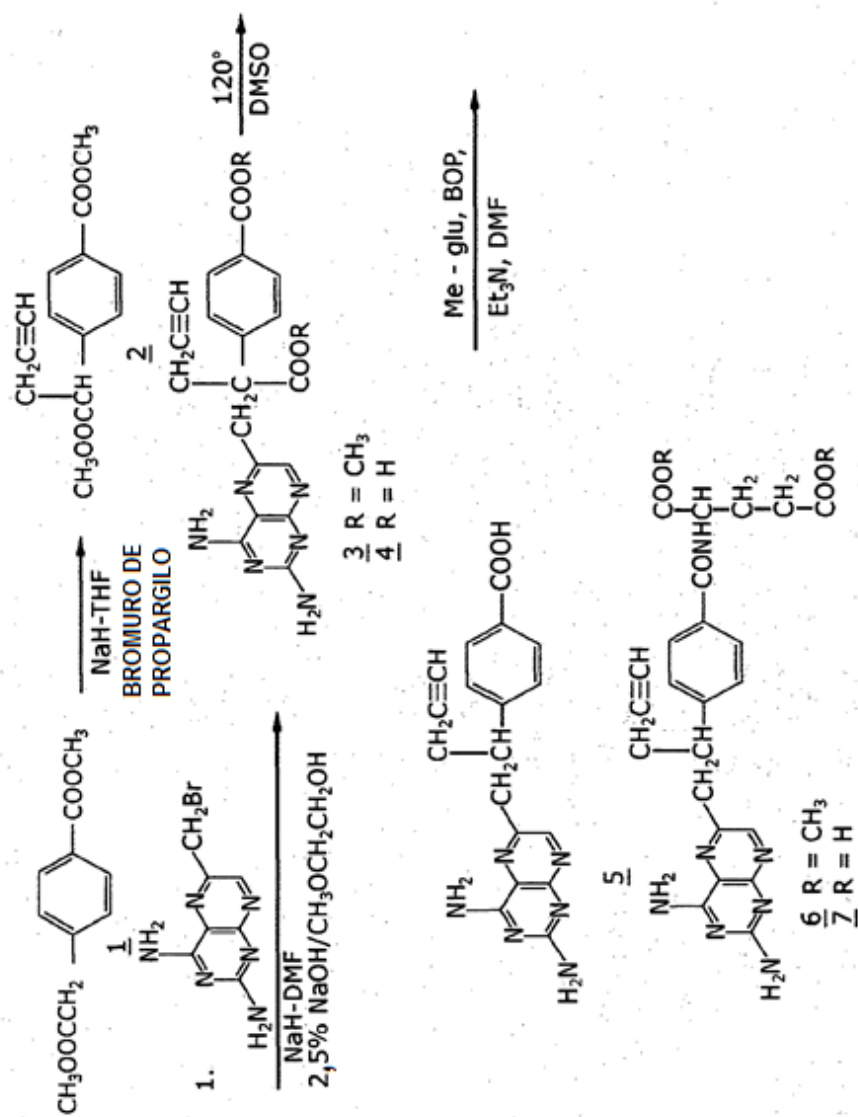


FIG. 1

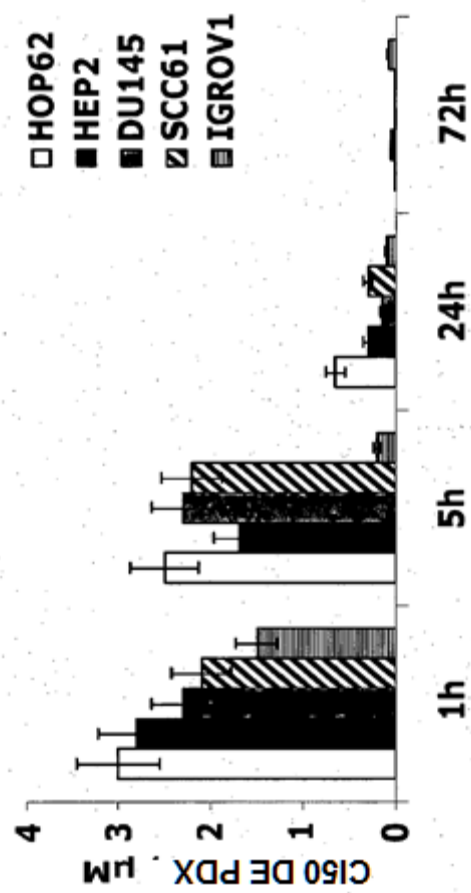


FIG. 2A

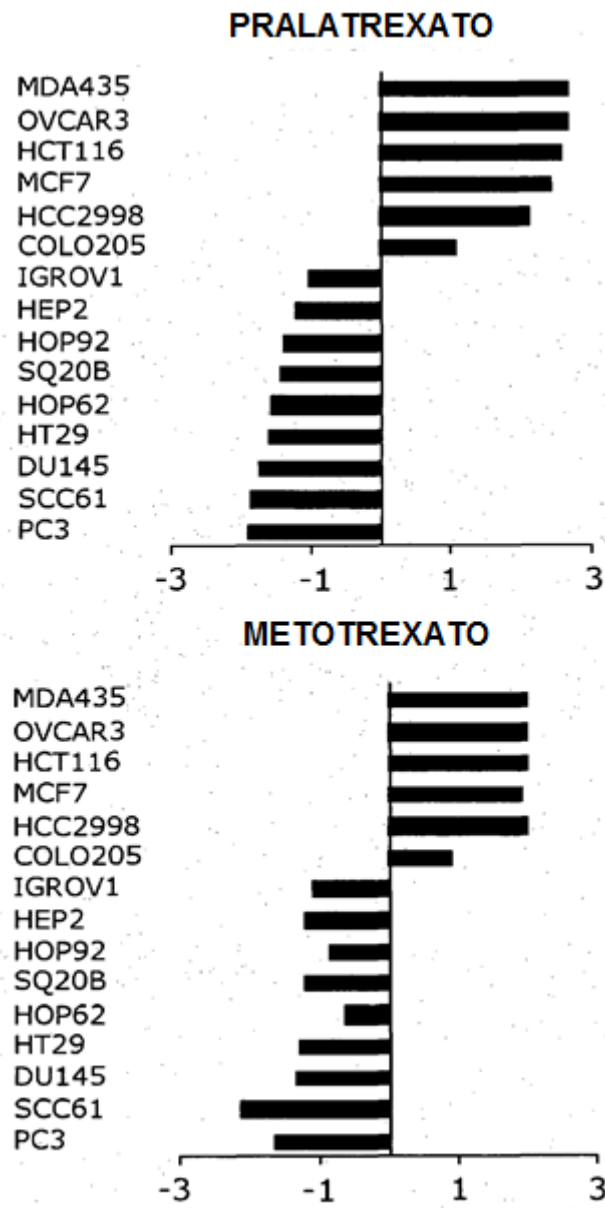


FIG. 2B

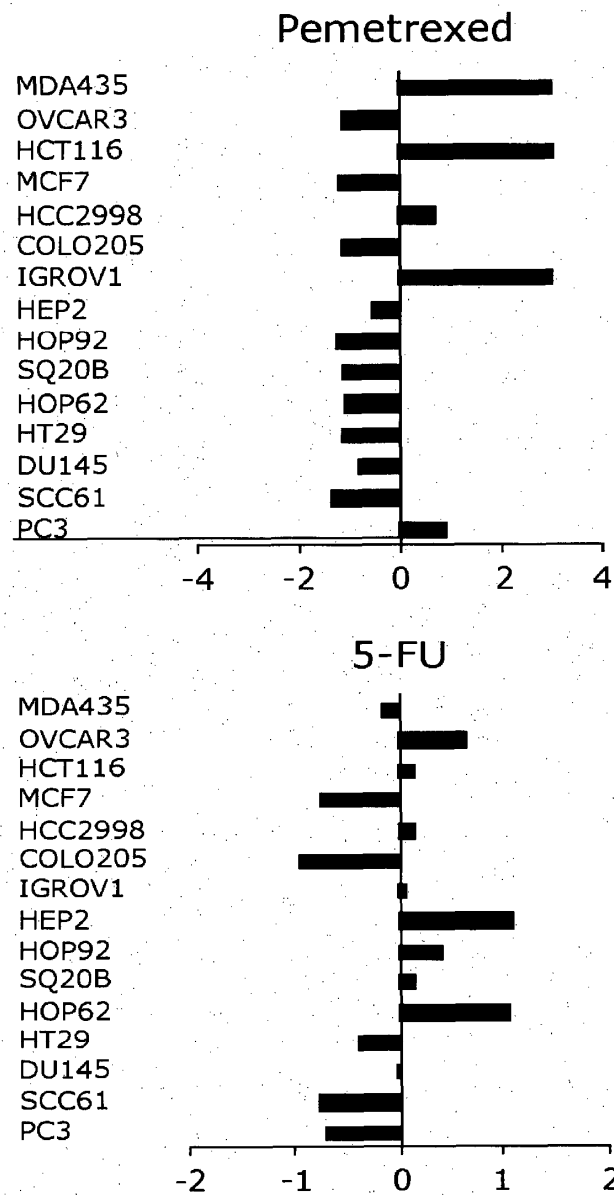


FIG. 2B (CONT)

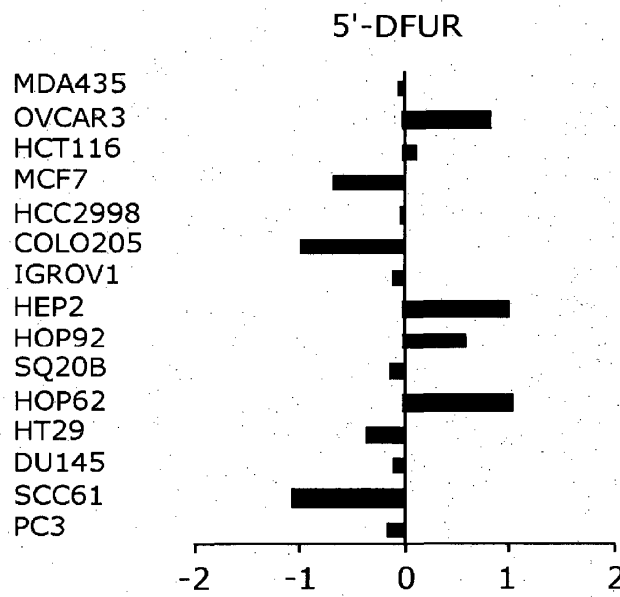


FIG 2B (CONT)

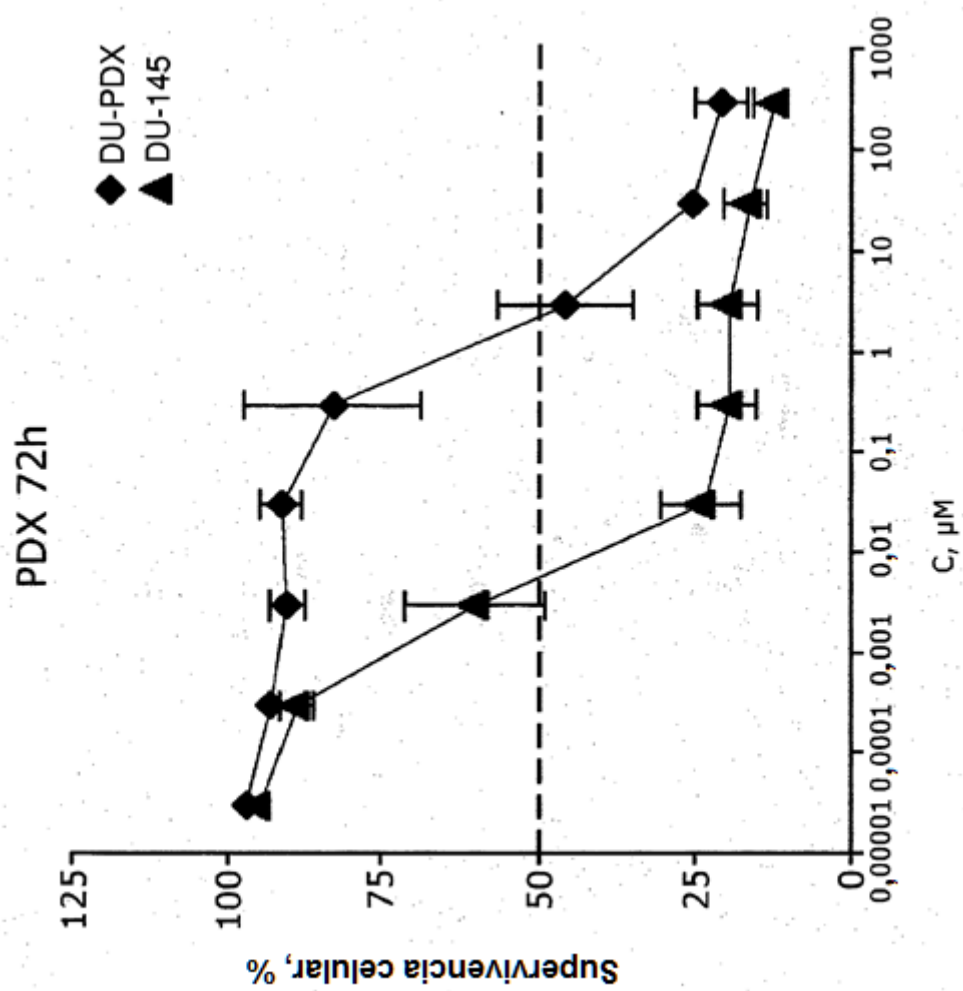


FIG. 3

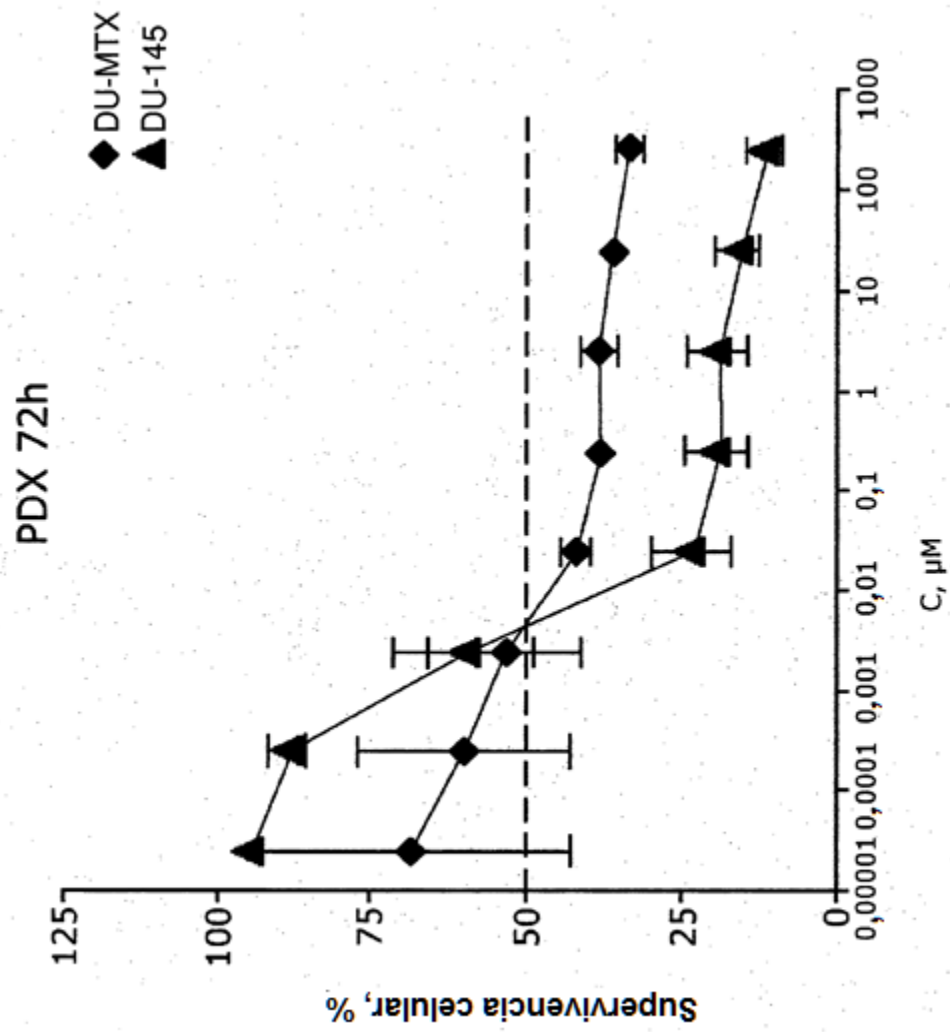


FIG. 3 (CONT)

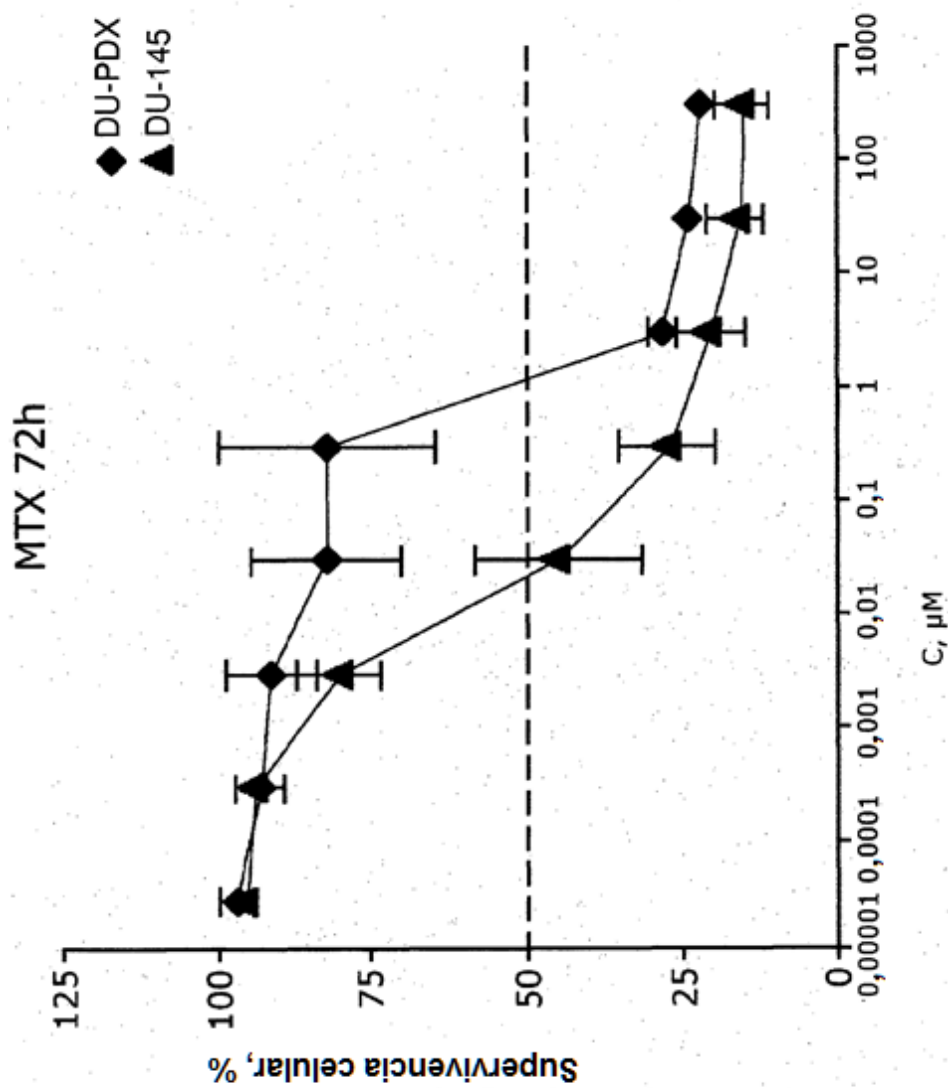


FIG. 3 (CONT)

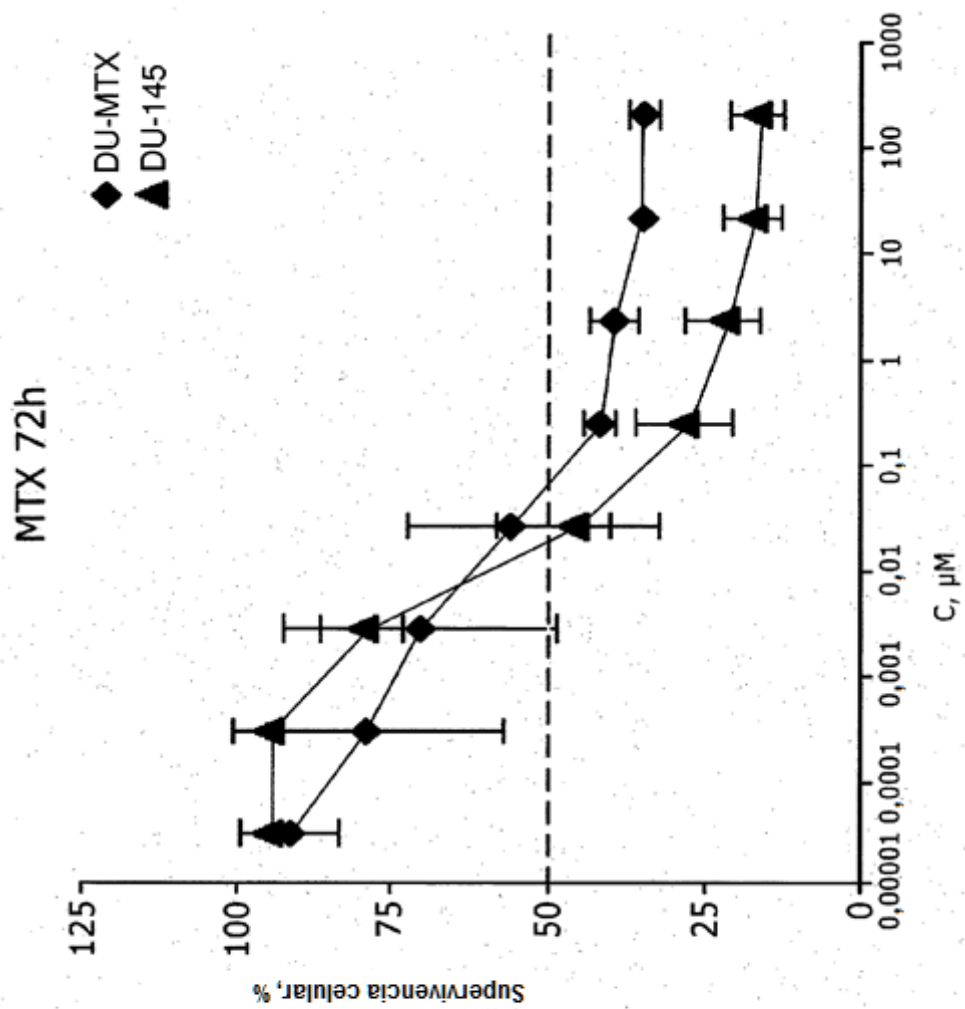


FIG. 3 (CONT)

Línea celular	CI50. μM	
	PDX	MTX
DU145	0,01	0,02
DU-PDX	2,7	2,1
DU-MTX	0,02	0,15

FIG. 3 (CONT)

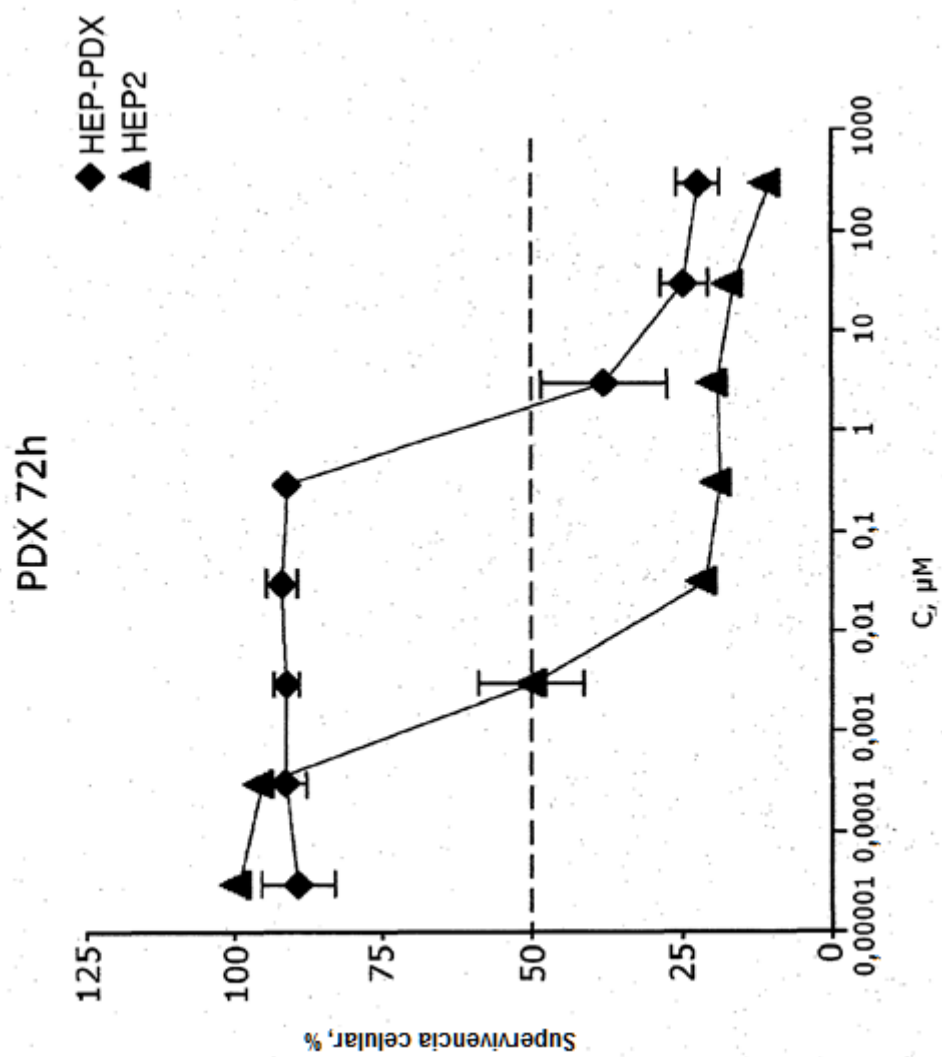


FIG. 4

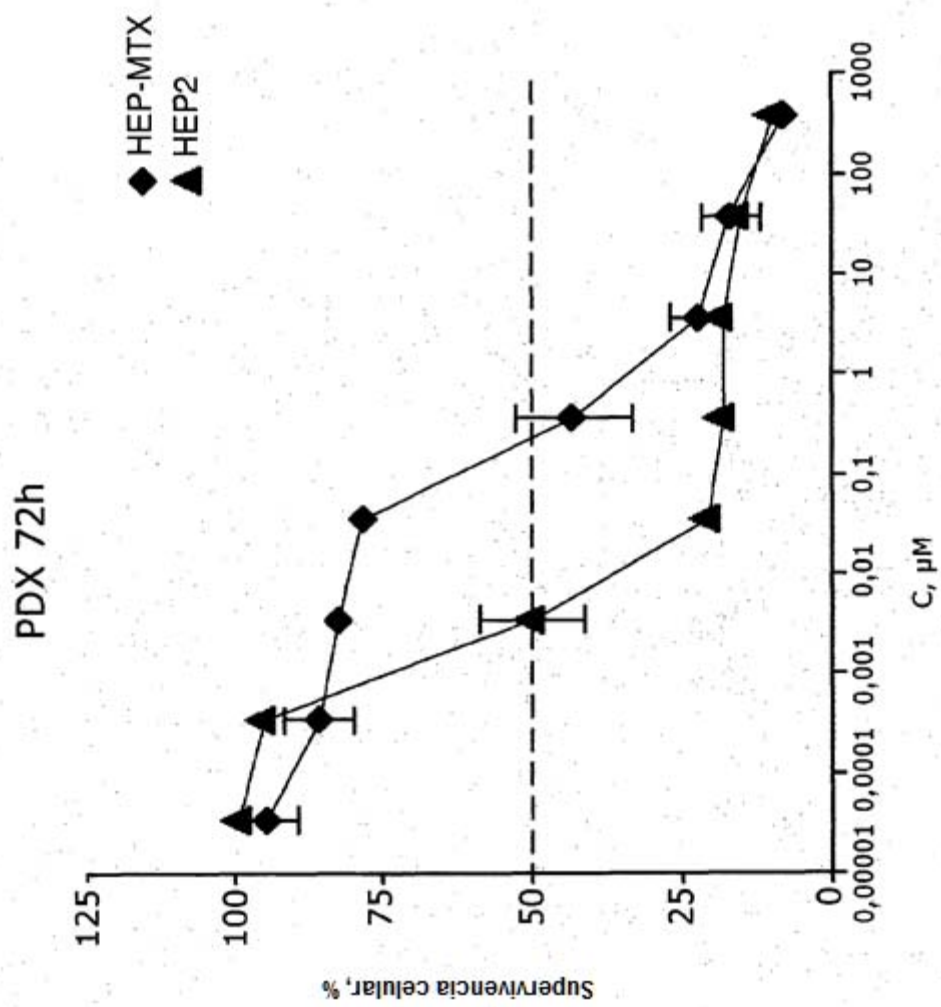


FIG. 4 (CONT)

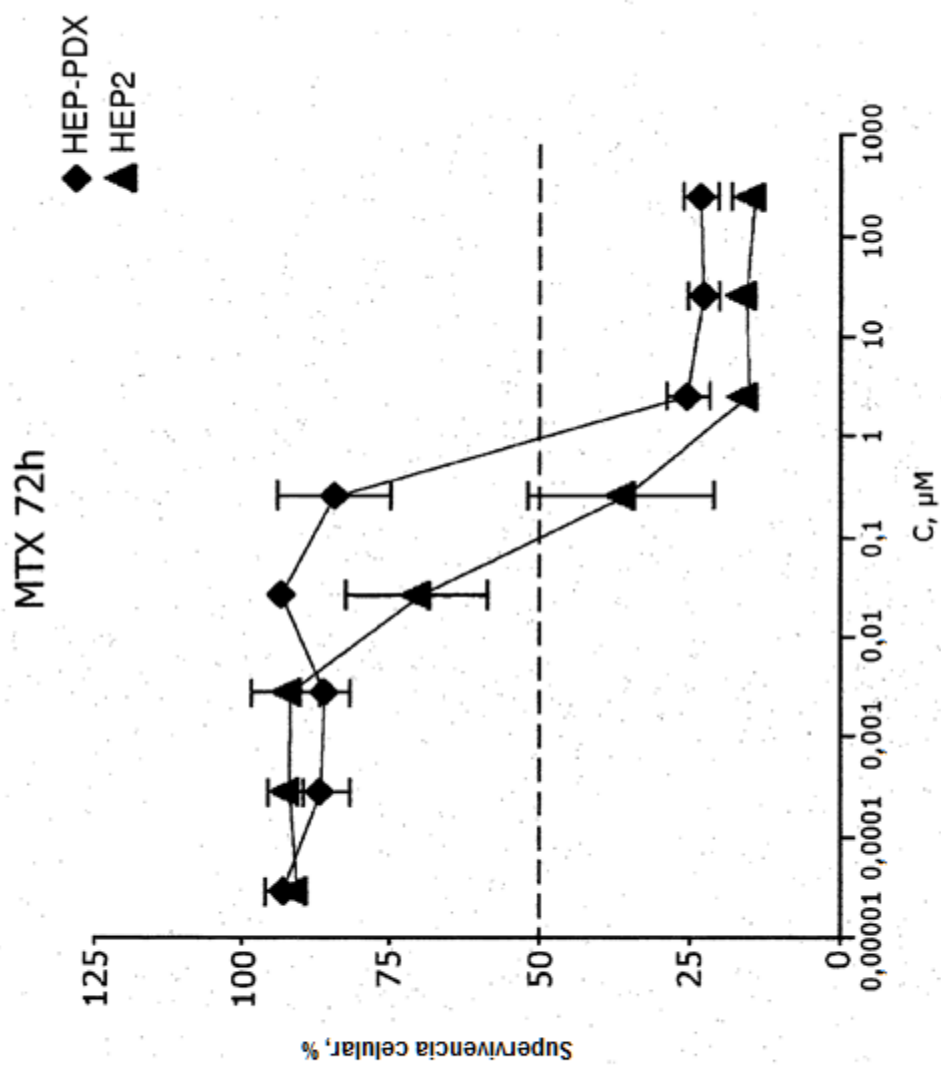


FIG. 4 (CONT)

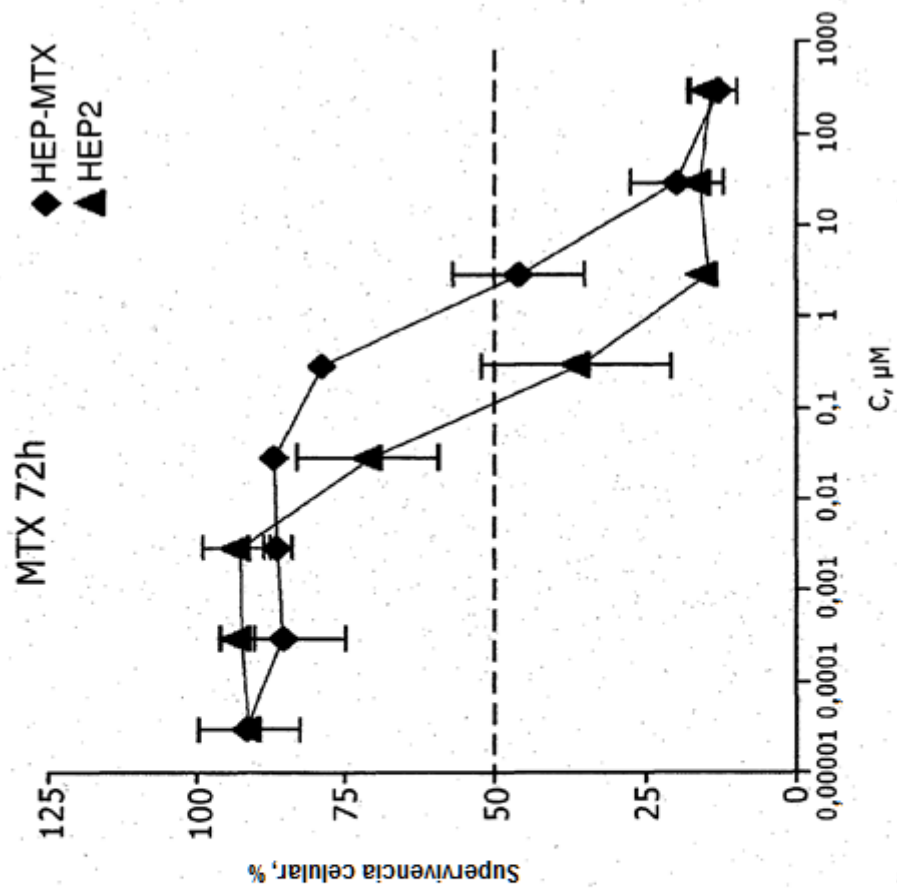


FIG. 4 (CONT)

Línea celular	CI50, μM	
	PDX	MTX
HEP2	0,004	0,2
HEP-PDX	2,5	2,0
HEP-MTX	0,25	2,7

FIG. 4 (CONT)

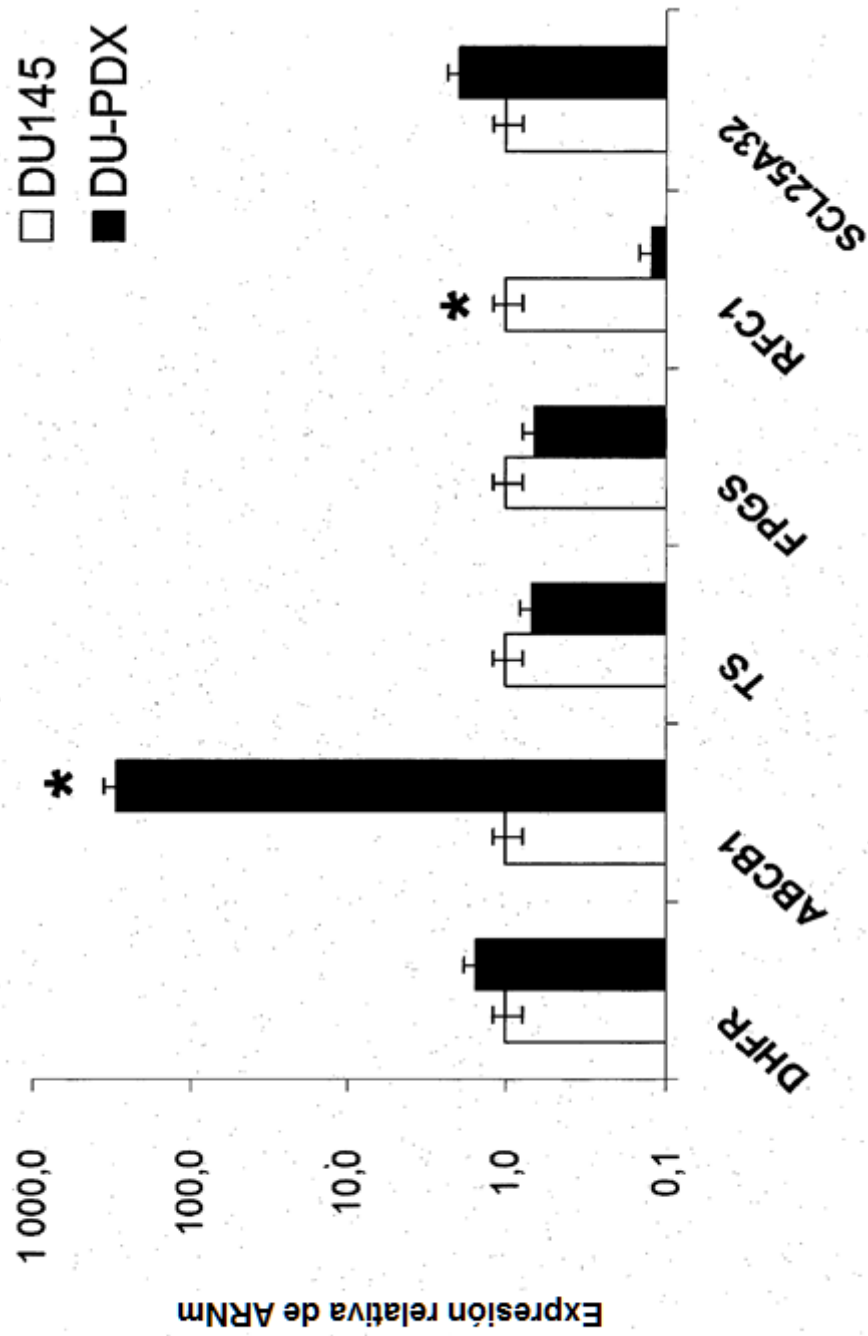


FIG. 5

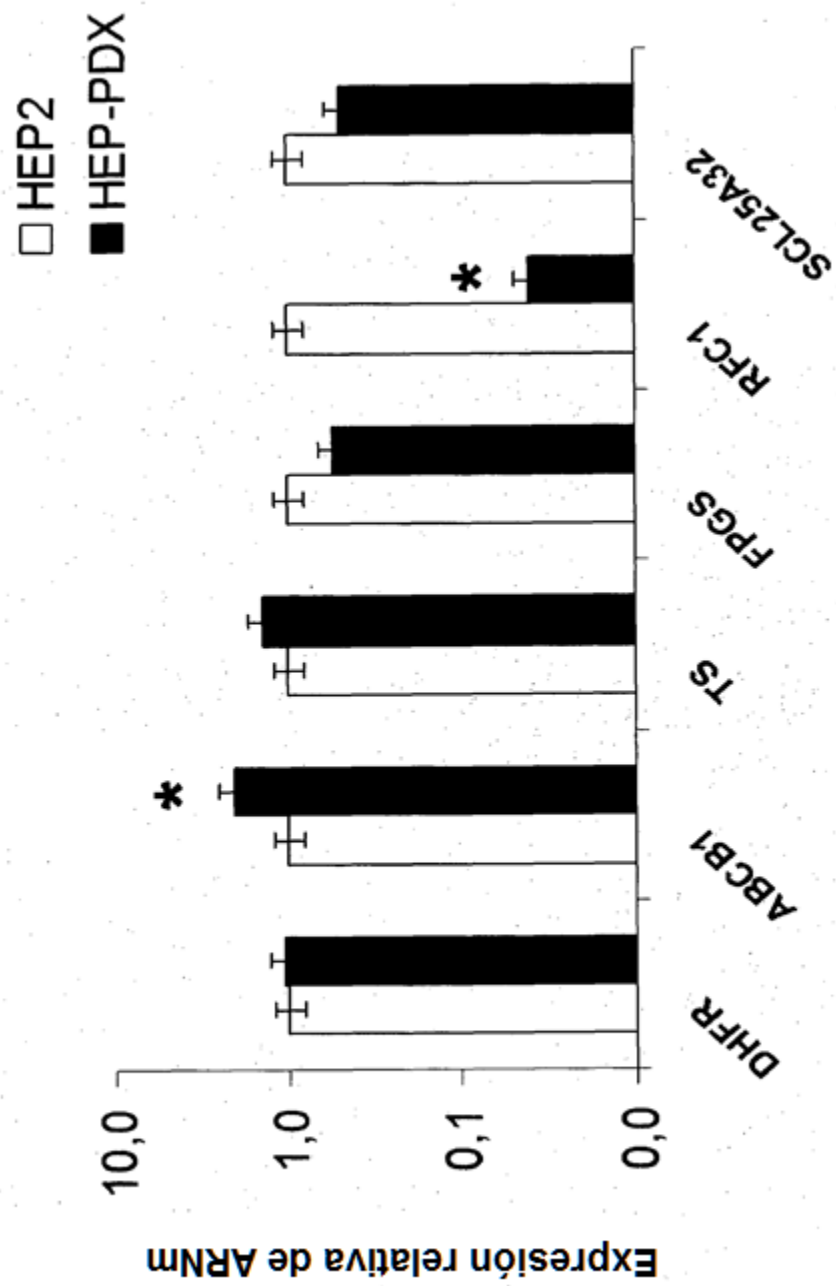


FIG. 5 (CONT)

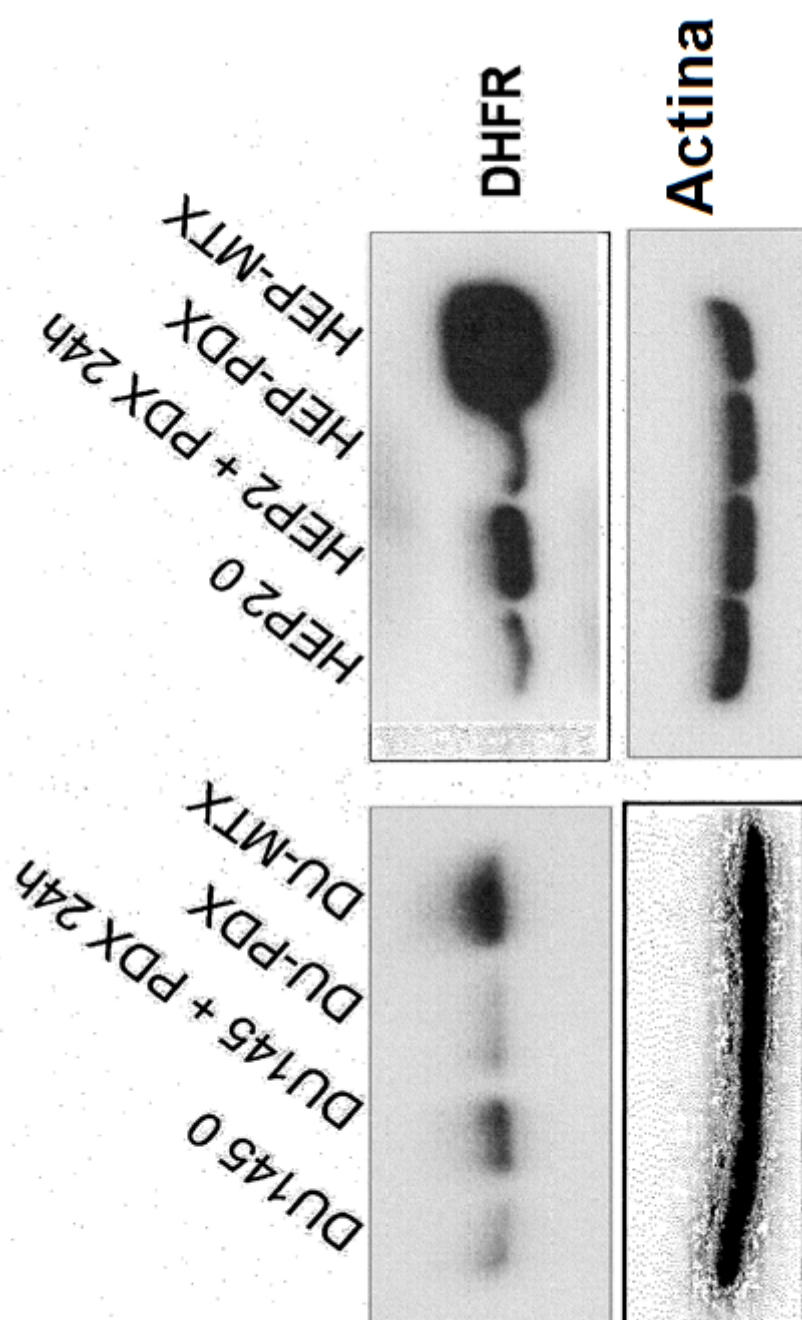


FIG. 6

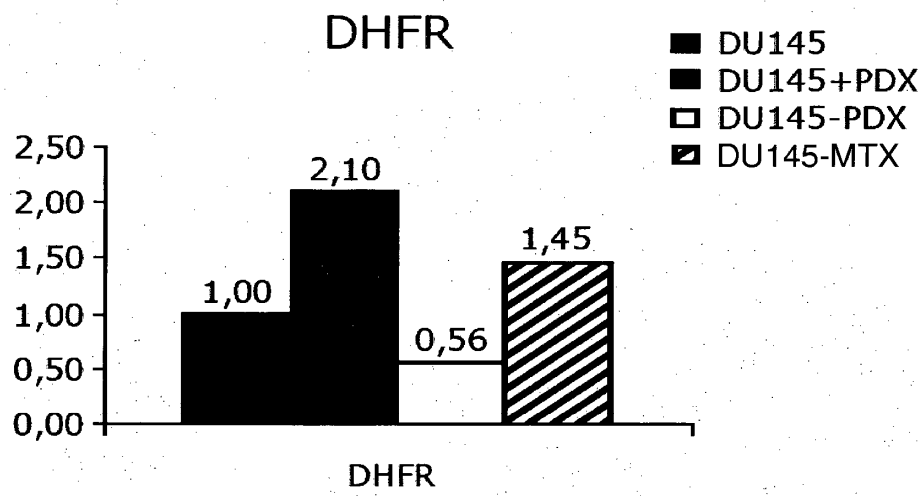


FIG. 7

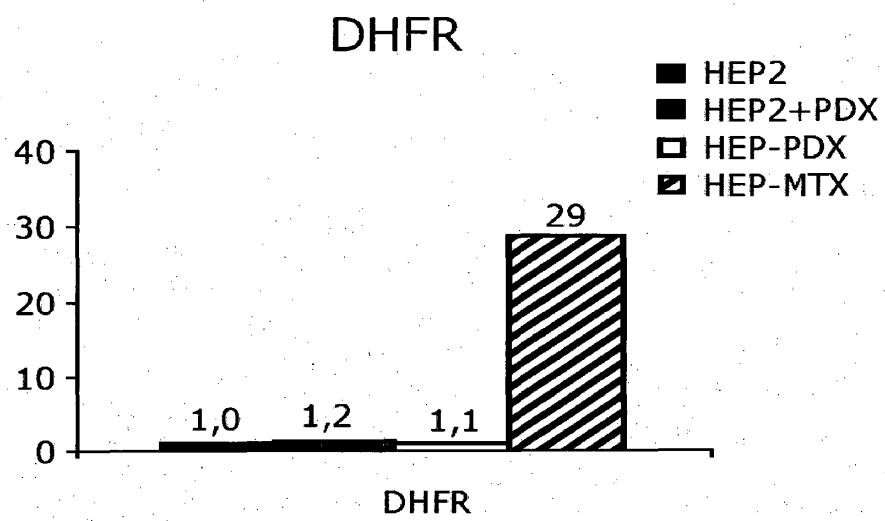


FIG. 7 (CONT)