



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 585**

51 Int. Cl.:
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03712531 .7**
86 Fecha de presentación : **04.04.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1496908**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

54 Título: **Combinación de glivec(STI571) con un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, especialmente flavopiridol en el tratamiento de cáncer.**

30 Prioridad: **10.04.2002 US 371330 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

73 Titular/es: **Virginia Commonwealth University**
1101 East Marshall Street, Room 1-025
Richmond, Virginia 23298-0568, US
The Government of the United States of America,
as represented by The Department of Veterans
Affairs

72 Inventor/es: **Dent, Paul;**
Grant, Steven;
Krystal, Geoffrey y
Yu, Chunrong

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 303 585 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

Combinación de glivec(STI571) con un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, especialmente flavopiridol en el tratamiento de cáncer.

La invención se relaciona con una combinación farmacéutica que comprende (a) un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) y (b) 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida (de aquí en adelante: "Compuesto I") y opcionalmente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable para utilizar simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de leucemia positiva-Bcr/Abl que es resistente a un compuesto de fórmula 1.

El oncogen Bcr/Abl codifica una proteína de fusión que se encuentra en las células del 95% de los pacientes con leucemia mielógena crónica (CML). La activación constitutiva de la quinasa tirosina Bcr/Abl confiere una ventaja de supervivencia para células hematopoyéticas, que contribuyen a la transformación leucémica. Más específicamente, la expresión de la quinasa Bcr/Abl que da células relativamente insensibles a apoptosis inducida por estímulos diversos, que incluyen privación del factor de crecimiento y drogas citotóxicas. Recientemente, se dirige la atención de manera considerable al Compuesto I, un inhibidor de quinasa tirosina que inhibe el Bcr/Abl, c-Kit, y en un grado inferior, otras quinasas. La SAL I (la sal de monomesitato del Compuesto I) se ha mostrado por inhibir el crecimiento de e inducir la apoptosis en células de leucemia positiva-Bcr/Abl *in vitro*. De forma significativa, la administración oral de la SAL I a pacientes con CML resulta en respuestas clínicas en la gran mayoría de los pacientes. Sin embargo, la emergencia de la resistencia de la SAL I en la respuesta inicial de los pacientes CML a este agente ha incitado la búsqueda de aproximaciones para el tratamiento de esta enfermedad.

La presente invención reporta que una terapia de combinación de una leucemia Bcr/Abl⁺ resistente a la SAL I caracterizada por la sobreexpresión de Bcr/Abl, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor CDK, particularmente flavopiridol (FP) y una cantidad terapéuticamente efectiva de SAL I, puede producir un efecto terapéutico que es mayor que la obtenible por una administración única de una cantidad terapéuticamente efectiva de un único inhibidor CDK o la única SAL I.

La presente invención se relaciona con una combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, tal como una preparación combinada o una combinación fija farmacéutica, que comprende (a) inhibidor de quinasa dependiente de ciclina y (b) Compuesto I en el que los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención pertenece a una combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, tal como una preparación combinada o una combinación fija farmacéutica, que comprende cantidades efectivas sinérgicamente de (a) inhibidor de quinasa dependiente de ciclina y (b) Compuesto I en el que los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Todas las referencias WO (número) se significa que se refieren a las publicaciones de la WIPO de las solicitudes de patente PCT de las correspondientes referencias.

La sal de adición de ácido monometanosulfónico del Compuesto I (de aquí en adelante "SAL I") y una forma de cristal preferida de este se describen en la WO 99/03854 publicada en Enero 28, 1999.

La mayoría de inhibidores CDK actúan en CDK 1, 2, 4, 6 o 7 o son capaces de inhibir varias de aquellas quinasas. Ejemplos de inhibidores CDK de acuerdo con la invención son ácido nucleico que codifica para los inhibidores de CDK, péptidos e inhibidores peptidomiméticos, aptámeros de péptido, moléculas pequeñas tal como flavonoides, derivados de purina, derivados de pirimidina, butirrolactona1, derivados de indigoid bisindol, bencenosulfonamidas, derivados de tiazol, derivados de paulonas, derivados de estaurosporina, compuestos de pirazolopiridina, derivados de indol, compuestos de amino-pirazol.

Los ácidos nucleicos que codifica para los inhibidores CDK se describen aquí en la US 5.621.082 y WO 99/06540. Los péptidos e inhibidores peptidomiméticos se describen en la EP 0 666 270 A2, Bandara *et al.*, Nature Biotechnology 1997, 15, 896-901 y Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 4325-29. Los aptámeros de péptido se describen en Cohen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 14272-77. Las moléculas pequeñas se reseñan en Exp. Opin. Invest. Drugs 1998, 7, 865-87 y Curr. Opin. in Drug Discov. & Devel.1999, 2, 274-85.

Los flavonoides de acuerdo con la invención son catequinas, genisteína y conjugados de genisteína-anticuerpo, por ejemplo B43-genisteína y (factor de crecimiento epidérmico) EGF-genisteína, quercetina, flavopiridol y derivados de flavopiridol.

El flavopiridol (L86-8275, HMR 1275) es una flacona semisintética, derivada de la rohitucina flavonoide y se describe en la US4900727, la EP241003 y Int. J. Oncology 1996, 9, 1143-1168. El flavopiridol es 4H-1-benzopiran-4-ona, 2-(2-clorofenil)-5,7-hidroxi-8-(3-hidroxi-1-metil-4-piperidinil)-, clorhidrato, (-)-cis-. El flavopiridol actúa como un inhibidor potente de quinasas dependientes de ciclina múltiples (CDK), que incluyen CDK1, 2, 4/6, y 7. Los

ES 2 303 585 T3

derivados de flavopiridol tal como tio- y oxoflavopiridoles se describen en J. Med. Chem. 2000, 43, 4126-4134, los análogos de flavopiridol se describen en la patente US 5.733.920, WO 97/42949 y WO 98/17662.

Los derivados de purina de acuerdo con la invención se describen en Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997, 7, 2697-2702; Proc. Amer. Assoc. Cáncer Res. 1998, 39, 1207; Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 793-98; Science 1998, 281, 533-38; Chemistry & Biology 1999, 6, 361-75. Las purinas 2, 6, 9-trisustituidas se describen aquí en la US 6.316.456 B1, J. Med. chem. 1997, 40: 408-12 especialmente olomoucina, bohemia se describe en Drug. Metab. Dispos. 2001, 3, 326-34, CVT 313 se describe en J. Biol. Chem. 1997, 272:29207-211, CVT 2584 y CVT 2454 se describen en MEDI, 2000, 136:26, purvalanol B, R-roscovitina (CYC 202, 2-(R)-1-etil-2-hidroxietilamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina), purinas 2,6-disustituidas, por ejemplo NU 2058, WO 99/02162, purinas 6,9-disustituidas se describen en WO 99/43675 y WO 99/43676.

El término “derivado basado en pirimina” incluye pero no se restringe a los compuestos como se describe en J. Med. Chem. 2000, 43, 2797-2804, por ejemplo NU 6027 y NU 6034 y en 91st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2000, 41:314 (PD 0183812) así como también en la WO 98/33798, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 1998, 39, Abst. 3796 y Proc. Amer. Assoc. Cáncer Res. 1998, 39, Abst. 3794.

El término “derivados de paullona” significa los compuestos como se describe en Int. J. Chem. 1999, 42, 2909-2919 y Cancer Research 1999, 59:2566-2569, por ejemplo alsterpaulona (NSC 705701, 9-nitropaulona) y kenpaulona (NSC 664704, 9-bromopaulona).

El término “bencenosulfonamidas” incluye pero no se restringe a los compuestos como se describe en Owa *et al.*, J. Med. Chem., 1999, 42, 3789-99, especialmente, E 7070 (ER-35744).

Los derivados de tiazol son amino- e isotiazoles como se describe en la US 6.040.321, US 6.262.096, WO 99/24416, WO 99/21845 y WO 99/62890, especialmente AG 12286 y AG 12275 (MEDI 1999, 214).

Un derivado de estaurosporina es en particular estaurosporina, LY 333531, MLR52, UCN-01 (7-hidroxi-estaurosporina), UCN-02, midostaurina (EP0296110), NA 382, 2-metil K252a, K-252a (J. Cell.biol 1991, 115:1275), KT-5720, Ro-31-8425, Ro-31-7549 y Ro-31-8220.

Los derivados de indigoid bisindol se describen en la WO 99/62503 y la WO 00/61555.

Los inhibidores de pirazolopiridina se describen en MEDI 2000, 38 especialmente BMS 265246.

Los derivados de indol de acuerdo con la invención son SU9516 ((Z)-3-(1H-Imidazol-5-ilmetileno)-5-metoxi-2,3-dihidro-1H-indol-2-ona), los inhibidores de oxindol se describen en 90th y 91 st Annual Meeting Amer. Assoc. Cancer Res. 1999, 724; 2000, 41:31, en Luzzio *et al.*, 1999 Abst. 4102, in Inpharma. 2000, 1237: 7-8 in Expert Opinion on Investigational Drugs 8:903-9 y en la WO 99/15500, especialmente. GW 2059, GW 8510, GW 5181 y GW 9499.

Los compuestos de amino-pirazol se describen en la US09/835566.

Los NSC 373853, NSC 373854, NSC 625987 y NSC 645787 se reportan en el Annual Meeting of the Amer. Soc. Clinic. Oncology, 1997, 212.

De forma sorprendente, el FP interactúa con el Compuesto I, por ejemplo la SAL I en una forma altamente sinérgica al activar la lesión mitocondrial y apoptosis en tales células, que incluyen aquellas resistentes al Compuesto I y exhiben amplificación Bcr/Abl. De forma inesperada, se ha encontrado que el efecto anti-proliferativo en tumores de una combinación que comprende el FP y Compuesto I es mayor que el efecto máximo que se puede lograr con cualquier tipo de ingrediente solo.

Los resultados presentes indican que el flavopiridol inhibidor de CDK de forma marcada incrementa el daño mitocondrial mediado por la SAL I y la apoptosis en células leucémicas Bcr/Abl⁺, incluyen células K562 resistentes a SAL-1, especialmente células K562R que expresan niveles incrementados de la proteína Bcr/Abl.

La invención pertenece a una combinación en donde el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina se selecciona del grupo que consiste de FP, CYC 202 y E 7070.

El término “una preparación combinada”, como se utiliza aquí define especialmente a “kit de partes” en el sentido que los compañeros de combinación (a) y (b) como se definió anteriormente se pueden dosificar independientemente uno del otro o mediante el uso de combinaciones fijas diferentes con cantidades distinguidas de los compañeros de combinación (a) y (b), es decir, en forma simultánea o en puntos de tiempo diferentes. Las partes del kit de partes pueden luego, por ejemplo ser administradas en forma simultánea o en forma de tapas cronológicamente, que es en puntos de tiempo diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. Muy preferiblemente, los intervalos de tiempo se seleccionan tal que el efecto en la enfermedad tratada en el uso combinado de los compañeros es más grande que el efecto que se podría obtener por el uso de sólo uno cualquiera de los compañeros de combinación (a) y (b). La proporción de las cantidades totales del compañero de combinación (a) al compañero de combinación (b) a ser administrado en la preparación combinada se puede variar, por ejemplo para

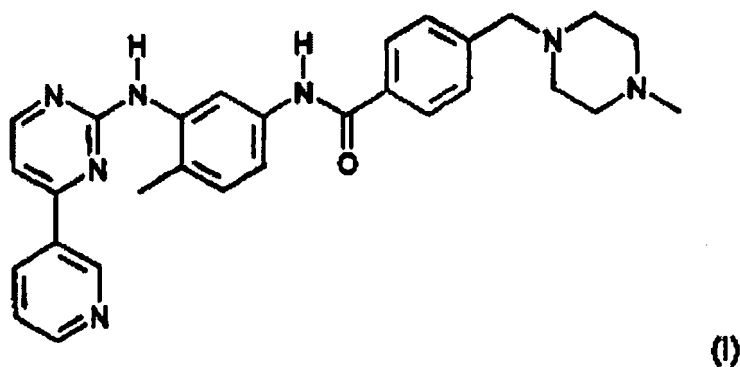
hacer frente a las necesidades de una sub-población de pacientes a ser tratados o las necesidades del paciente único cuyas necesidades diferentes pueden ser debidas a edad, sexo, peso corporal, etc. de los pacientes. Preferiblemente, hay por lo menos un efecto benéfico, por ejemplo, una mejora mutua del efecto de los compañeros de combinación (a) y (b), en particular un sinergismo, por ejemplo más que el efecto aditivo, efectos ventajosos adicionales, menos efectos colaterales, un efecto terapéutico combinado en una dosificación no efectiva de uno o ambos de los compañeros de combinación (a) y (b), y muy preferiblemente un sinergismo fuerte de los compañeros de combinación (a) y (b).

El término “tratamiento” comprende la administración de los compañeros de combinación a un animal de sangre caliente en necesidad de tal tratamiento con el objetivo de curar el tumor o para tener un efecto en la regresión del tumor o en el retardo del progreso de una enfermedad.

El término “retardo del progreso” como se utiliza aquí significa que el crecimiento del tumor o generalmente, el progreso de la enfermedad es por lo menos retrasado u obstaculizado por el tratamiento y tales pacientes exhiben índices de supervivencia mayores que los pacientes que no se tratan o se tratan con la monoterapia.

El término “leucemia resistente a SAL-I” como se utiliza aquí define especialmente una leucemia en la que la SAL I muestra una reducción de su eficacia terapéutica, esto incluye pero no se restringe a leucemia que exhibe resistencia al tratamiento con SAL I mediante amplificación de gen Bcr/Abl, incrementando la expresión de la proteína Bcr/Abl y la mutación del dominio de quinasa Abl.

El compañero de combinación (b) Compuesto I es 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida que tiene la fórmula I



Este se puede preparar como se describe en la WO 99/03854.

La estructura de los agentes activos citados se puede tomar de la edición actual del compendio estándar “El Índice Merck” o de las bases de datos, por ejemplo Patentes Internacionales (por ejemplo IMS World Publications). El contenido correspondiente de este es por lo tanto incorporado como referencia. Cualquier persona experta en la técnica es completamente capaz, con base en estas referencias, de fabricar y probar las propiedades e indicaciones farmacéuticas en modelos de prueba están, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se entenderá que las referencias a los compañeros de combinación (a) y (b) significan que también incluyen sus sales farmacéuticamente aceptables respectivas. Si el compañero de combinación tiene por lo menos un grupo básico, este puede formar sales de adición ácida. El compañero de combinación que tiene un grupo ácido (por ejemplo COOH) también puede formar sales con bases. El compañero de combinación (a) o (b) o una sal farmacéuticamente aceptable de este también se puede utilizar en la forma de un hidrato o incluir otros disolventes utilizados para la cristalización. La 4-(4-metilpiperazin-9-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida, es decir compañero de combinación (a), se utiliza preferiblemente en la presente invención en la forma de su sal de monomesilato.

Una combinación que comprende (a) un inhibidor CDK y (b) Compuesto I en el que los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable y opcionalmente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable, se referirá de aquí en adelante como una Combinación de la invención.

Las Combinaciones de la invención inhiben el crecimiento de tumores sólidos, pero también de tumores líquidos. Adicionalmente, las Combinaciones de la invención exhiben efectos benéficos en el tratamiento de enfermedades asociadas con angiogénesis desregularizada. En una modalidad preferida de la invención, la enfermedad proliferativa a ser tratada con una Combinación de la invención es leucemia, especialmente leucemia Bcr/Abl⁺ y preferiblemente leucemia resistente a SAL-I.

Lo más sorprendente es el hallazgo experimental *in vivo* que la administración de una Combinación de la invención comparada con una monotorepia que aplica uno solo de los ingredientes activos farmacéuticamente utilizados en la Combinación de la invención resulta no sólo en un efecto benéfico, especialmente sinérgico, por ejemplo efecto anti-proliferativo, por ejemplo con respecto al retardo del progreso de una enfermedad proliferativa o con respecto a un cambio en el volumen del tumor, pero también en efectos benéficos sorprendentes adicionales, por ejemplo menos efectos colaterales y una disminución de la mortalidad y morbilidad. Las Combinaciones de la invención son adecuadas en particular en el tratamiento de enfermedades proliferativas refractarias con quimioterapéuticos conocidos como agentes anti-cáncer así como también enfermedades proliferativas refractarias a tratamiento con SAL I. Las Combinaciones de la invención son también adecuadas para prevenir la diseminación metastásica de los tumores y el crecimiento o desarrollo de micrometástasis.

Un beneficio adicional es que se pueden utilizar dosis más bajas de los ingredientes activos de la Combinación de la invención, por ejemplo, que las dosificaciones necesarias no sólo son a menudo más pequeñas sino que también se aplican con menos frecuencia, o se pueden utilizar con el fin de disminuir la incidencia de los efectos colaterales similares, por ejemplo, diarrea o náusea observada con uno solo de los compañeros de combinación. Esto es de acuerdo con los deseos y requerimientos de los pacientes a ser tratados.

Esto se puede mostrar al establecer modelos de prueba tales como una Combinación de la invención resulta en los efectos benéficos descritos aquí anteriormente. La persona experta en la pertinente técnica es completamente capaz de seleccionar un modelo de prueba importante para probar tales efectos benéficos. La actividad farmacológica de una Combinación de la invención puede, por ejemplo, ser demostrada en un estudio clínico en un procedimiento de prueba como se describe de aquí en adelante.

Los estudios clínicos adecuados son en particular estudios aleatorizados, de doble ciego, de control de placebo, paralelos en pacientes cancerosos en fase terminal. Tales estudios son, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia utilizando los ingredientes activos y una terapia utilizando una Combinación de la invención, y para proporcionar en particular la sinergia de los ingredientes activos de las Combinaciones de la invención. Los criterios de valoración en tales estudios pueden ser los efectos en las calificaciones de dolor, uso analgésico, estado de desempeño, calificaciones de calidad de Vida o tiempo o progreso de la enfermedad. La evaluación de los tumores en periodos de tiempo regulares, por ejemplo cada 4, 6 o 8 semanas, es un acercamiento adecuado para determinar el efecto de la Combinación de la invención. En un diseño de estudio adecuado, los pacientes son, por ejemplo, receptores por ciclo de tratamiento de 2 semanas, diariamente SAL I en una dosis que varía de 50 a 800 mg de la sustancia activa y FP en una dosis que varía de 5 a 75 mg/m² /día durante 3 días. La duración mínima de tal un estudio debe ser aproximadamente, por ejemplo 4 semanas.

Es un objeto de esta invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que es efectiva terapéuticamente articulada contra una enfermedad proliferativa que comprende la Combinación de la invención. En esta composición, los compañeros de combinación (a) y (b) se pueden administrar juntos, uno después del otro o separadamente en una forma de unidad de dosificación combinada o en dos formas de unidad de dosificación separadas. La forma de unidad de dosificación también puede ser una combinación fija.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden preparar en una forma conocida *per se* y aquellos son adecuados para administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), que incluyen hombres, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de por lo menos un compañero de combinación activo farmacológicamente solo o en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para aplicación enteral o parenteral. En una modalidad de la invención, uno o más de los ingredientes activos se administran intravenosamente.

La composición farmacéutica novedosa contiene, por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 60%, de los ingredientes activos. Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, aquellas en formas de unidad de dosificación, tales como comprimidos recubiertos con azúcar, comprimidos, cápsulas o supositorios, y adicionalmente ampollas. Si no se indica otra cosa, estos se preparan en una forma conocida *per se*, por ejemplo por medio de procesos de mezclado convencional, granulación, recubrimiento con azúcar disolución o liofilización. Se apreciará que la unidad de contenido de un compañero de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesitada en constituir en sí misma una cantidad efectiva ya que la cantidad efectiva necesaria se puede lograr mediante administración de una pluralidad de unidades de dosis.

En particular, una cantidad terapéuticamente efectiva de cada uno de los compañeros de combinación de la Combinación de la invención se puede administrar en forma simultánea o secuencialmente y en cualquier orden, y los componentes se pueden administrar separadamente o como una combinación fija. Por ejemplo, el método de retardo del progreso o tratamiento de una enfermedad proliferativa de acuerdo con la invención pueden comprender (i) administración del primer compañero de combinación en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) administración del segundo compañero de combinación en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, en forma simultánea o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades efectivas terapéuticamente articuladas, preferiblemente en cantidades efectivas sinérgicas, por ejemplo en dosificaciones diarias que corresponden a las cantidades descritas aquí. Los compañeros de combinación individuales de la Combinación de la invención se pueden administrar separadamente en diferentes momentos durante el curso de la terapia o concurrentemente en formas de

combinación únicas o divididas. Adicionalmente, el término administrar también abarca el uso de una prodroga de un compañero de combinación que convierte *in vivo* al compañero de combinación como tal. Por lo tanto la invención actual se entiende como la que abarca todos de tales regímenes de tratamiento alterno o simultáneo y el término “administrar” se interpreta de acuerdo con lo anterior.

La dosificación efectiva de cada uno de los compañeros de combinación empleados en la Combinación de la invención pueden variar dependiendo del compuesto particular o composición farmacéutica empleada, el modo de administración, la afección a ser tratada, la severidad de la afección a ser tratada. Así, el régimen de dosificación de la Combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la ruta de administración, la función hepática y renal del paciente. Un médico, o veterinario medianamente experto puede fácilmente determinar y prescribir la cantidad efectiva de los ingredientes activos únicos requeridos para prevenir, rebatir, o detener el progreso de la afección. La precisión óptima en lograr la concentración de los ingredientes activos dentro del rango que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la disponibilidad de los cinéticos de los ingredientes activos para sitios objetivos. Esto involucra una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación de los ingredientes activos.

El flavopiridol se pueden administrar en un rango de dosis de 10 a 100 mg/m² /día, preferiblemente en un rango de dosis de 10 a 50 mg/m²/día, por ejemplo descrito en Clin. Cáncer Res. 2001, 7, 1590-9, por ejemplo 72 horas de infusión continua cada 14 días en una dosis de 50 mg/m²/día en una concentración de 0.1 a 0.2 mg/ml. Alternativamente, el FP se pueden administrar en una dosis preferida de 78 mg/m²/día durante 3 días cada 2 semanas con profilaxis anti-diarreica.

119.5 mg de la SAL I que corresponde a 100 mg del Compuesto I (base libre) como sustancia activa. Dependiendo de la especie, edad, condición individual, modo de administración, y el cuadro clínico en cuestión, la dosis efectiva de la SAL I, por ejemplo dosis diarias que corresponden a aproximadamente 50 a 1000 mg, por ejemplo 50 a 800 mg de la sustancia activa, preferiblemente 50 a 600 mg, por ejemplo 50 a 400 mg, se administran a animales de sangre caliente de aproximadamente 70 kg de peso corporal. Para pacientes adultos con leucemia, se puede recomendar una dosis de partida de 400 mg diariamente. Para pacientes con una respuesta inadecuada después de una evaluación de la respuesta a la terapia con 400 mg diariamente, la escala de dosis se puede considerar segura y los pacientes se pueden tratar mientras ellos se benefician del tratamiento y en la ausencia de toxicidades limitantes.

Por ejemplo, el FP y la SAL I son efectivos sinérgicamente en una proporción molar (FP:SAL I) en el rango de 1:1 a 1:20, preferiblemente 1:10, por ejemplo 1:1.33.

La invención también se relaciona con un método para administrar a un sujeto humano que sufre una enfermedad de tumor, especialmente leucemia, el Compuesto I o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que comprende administrar diariamente una cantidad farmacéuticamente efectiva del Compuesto I o una sal farmacéuticamente aceptable de este al sujeto humano durante un periodo que excede 3 meses. La invención se relaciona especialmente con tal método en donde se administra, una dosis diaria de 50 a 800 mg de la sustancia activa, especialmente 50 a 600 mg, por ejemplo 50 a 400 mg.

Cuando los compañeros de combinación se emplean en la Combinación de la invención se aplican en la forma como se marca en las drogas únicas, su dosificación y modo de administración puede tomar lugar de acuerdo con la información proporcionada en el prospecto de la droga marcada respectiva con el fin de resultar en el efecto benéfico descrito aquí, si no se menciona aquí de otra manera.

La Combinación de la invención puede ser una preparación combinada o una composición farmacéutica.

Adicionalmente, la presente invención pertenece al uso de una Combinación de la invención para el tratamiento de una enfermedad proliferativa y para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

Adicionalmente, la presente invención pertenece al uso de FP en combinación con la SAL I para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

Ejemplo 1

Células: las células de leucemia humana K562 se compran de ATCC, Rockville, MD y se cultivan en medio RPMI 1640 complementado con piruvato de sodio, vitaminas esenciales MEM, L-glutamato, penicilina, estreptomycin, y 10% de suero de becerro fetal inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT). Las células K562 resistentes a droga (K562R) se derivan de la línea parenteral al sub-cultivar en concentraciones progresivamente altas de doxorubicina como se describió previamente en Yanovich *et al.* La variante resistente a doxorubicina de la línea celular de leucemia humana K562 (K562R) demuestra la resistencia cruzada a otros antibióticos de antraciclina y alcaloides Vinca. Las células K562R tienen un fenotipo similar a aquel de las otras líneas celulares resistentes a multi-drogas (Yanovich *et al.*, 1989, Cancer Res. 49, 4499-4503). Ellas se cultivan en medio libre de droga antes de todos los procedimientos experimentales.

La preparación de fracciones S-100: Las células se siembran después del tratamiento con droga y la fracción S-100 citosólica se aísla por ultracentrifugación como se describe en Yu *et al.*, Mol. Pharmacol. 2001, 60, 143-53.

Evaluación de la apoptosis: las siguientes exposiciones a droga, preparaciones de citocentrífuga se tiñen con Wright-Giemsa y se observan mediante microscopia óptica para evaluar el grado de apoptosis como se describe en Wang Z. *et al.*, 1999 Cáncer Res. 59, 1259-67.

Determinación de la potencia de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$): la potencia de membrana mitocondrial se monitorea al medir la retoma de 3,3-yoduro de dihexiloxacarbocianina (DiOC₆) utilizando un citómetro de flujo FACScan y software CellQuest (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA) como se describió previamente en Wang Z. *et al.*, 1999 Cancer Res. 59, 1259-67.

1. La co-exposición de células K562 a SAL I y FP resulta en una potenciación marcada de apoptosis

(A) Las células K562 se exponen durante 48 h a 150 nM FP y la concentración señalada de la SAL I, después que se determina el porcentaje de las células apoptóticas mediante evaluación morfológica de láminas teñidas con Wright Giemsa- como se describió anteriormente. Los valores representan el medio para tres experimentos separados desarrollados en SD (desviación estándar) por triplicado.

SAL I (nM)	sin FP		+ FP (150 nM)		FP (nM)	sin SAL I		+ SAL I (200 nM)	
	media	DE	media	DE		media	DE	media	DE
0	0.7	0.1	0.9	0.1	0	0.7	0.1	5.7	0.8
50	1.9	0.0	2.2	0.2	50	1.9	0.1	12.1	1.7
100	1.8	0.3	4.9	0.8	100	2.4	0.4	35.8	3.1
150	3.0	0.1	22.5	3.1	150	3.2	0.7	56.3	4.5
200	4.6	0.6	58.1	4.7	200	6.1	1.0	63.7	5.0
250	8.9	2.0	62.7	3.6	300	18.5	2.2	77.0	3.2
300	20.3	3.2	74.0	3.1					
400	30.8	2.7	82.9	4.4					
500	53.8	3.5	85.5	5.7					

La exposición de las células K562 durante 48 h a concentraciones de SAL I < 300 nM inducen débilmente a apoptosis, mientras que las concentraciones de 300-500 nM inducen mortalidad en 20-50% de las células. Sin embargo, la co-administración de 150 nM de FP, que es esencialmente no tóxico en sí mismo es decir, induce < 5% de muerte celular), incrementa dramáticamente la apoptosis en células expuestas a las concentraciones de SAL I de 150 nM. La co-administración de FP en concentraciones de 100 nM potencian de forma marcada los efectos letales de 200 nM de SAL I, y estos efectos son particularmente pronunciados en el caso de 300 nM de FP.

(B) Las células K562 se exponen a 150 nM de FP + 200 nM de SAL I durante 24 o 48 h, después que se determina el porcentaje de células apoptóticas como se describió previamente. Los valores representan el medio para tres experimentos separados desarrollados en $\pm$ DE (desviación estándar) por triplicado.

		control	FP (150 nM)	SAL I (200 nM)	FP + SAL I
24 h	media	0.67	1.40	2.57	9.73
	DE	0.12	0.36	2.89	
48 h	media	0.73	3.33	5.97	55.57
	DE	0.09	1.20	4.01	

Los efectos letales de 200 nM de SAL I + 150 nM de FP, que se refleja por la aparición de células apoptóticas es moderado después de 24 h, pero muy extenso después de 48 h, indicando un modo de acción retardado para esta combinación de droga.

2. Inducción sinérgica de apoptosis por SAL I/FP

Las células K562 se exponen a varias concentraciones de FP y SAL I en una proporción fija (1:1.33) durante 48 h, después que el porcentaje de células apoptóticas o células que exhiben una declinación en $\Delta\Psi_m$ se monitorea como se describió anteriormente. El Índice de Combinación (CI) se determina en relación con la fracción de las células afectadas utilizando un análisis de Efecto de Dosis Medio. Los resultados son representativos de tres experimentos separados.

fracción afectada	0.075	0.120	0.250	0.560	0.712
CI - apoptosis	0.851	0.790	0.595	0.345	0.290
CI - $\Delta\Psi_m$	0.429	0.311	0.289	0.256	0.225

El análisis de efecto de Dosis de Medio se emplea para caracterizar interacciones entre la SAL I y el FP con respecto a la inducción de apoptosis y pérdida de $\Delta\Psi_m$ a 48 h. Los valores del Índice de Combinación (CI) menores de 1.0 se obtienen constantemente, particularmente en el caso de pérdida de $\Delta\Psi_m$, se denota una interacción altamente sinérgica entre la SAL I y el flavopiridol.

3. Co-exposición de células K562 resistentes a droga (K562R) que expresan niveles altos de la proteína Bcr/Abl a la SAL I y FP resulta en un incremento pronunciado en la apoptosis.

Las células K562R se exponen a 1.5 μM de SAL I $\pm$ 200 nM de FP durante 48 h, después que se determina el porcentaje de células apoptóticas como se describió anteriormente. Los valores representan el medio para tres experimentos separados desarrollados en $\pm$ S.D por triplicado.

	control	FP (200 nM)	SAL I (1.5 μM)	FP + SAL I
media	0.73	1.77	12.57	48.57
DE	0.12	0.35	1.62	3.10

Se emplea la línea celular K562 resistente a multi-droga (K562R), que exhibe aproximadamente un incremento de 300% en la expresión de proteína Bcr/Abl relativa a la línea parental. Las células K562R exhiben una disminución marcada en la susceptibilidad de la SAL I, con un I.C.₅₀ 10 veces más que de las células parenterales, por ejemplo, 3.0 μM versus 0.4 μM en células K562S parenterales. En las células K562R, una exposición de 48h a 150 nM de FP es no tóxico, mientras que 1.5 μM de SAL I induce apoptosis en solo ~10% de células. En contraste, la exposición de células K562S parenterales a 1.5 μM de SAL I durante 48 h resulta en > 95% de apoptosis. De forma significativa, el tratamiento combinado de células K562R con SAL I y FP incrementa el grado de apoptosis aproximadamente 5- veces comparado solo con SAL I (es decir, a ~50%). Estos hallazgos indican que la co-administración de una concentración sub-tóxica de FP potencia sustancialmente la letalidad relacionada con la SAL I en células resistentes que exhiben niveles incrementados de la proteína Bcr/Abl.

Ejemplo 2

Cápsulas con 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]fenil]benzamida metanosulfonato, forma β -cristal

Las cápsulas que contienen 119.5 mg del compuesto llamado en el título (= SAL I) corresponde a 100 mg del Compuesto I (base libre) como sustancia activa se prepara en la siguiente composición:

Composición	
SAL I	119.5 mg
Celulosa MK GR	92 mg
Crospovidona XL	15 mg
Aerosil 200	2 mg
Estearato de magnesio	1.5 mg
	230 mg

ES 2 303 585 T3

Las cápsulas se preparan al mezclar los componentes y llenar cápsulas de gelatina dura con la mezcla, tamaño 1.

Ejemplo 3

- 5 *Cápsulas con 4-[(4-metil-1-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]fenil]benzamida metanosulfonato, forma β -cristal*

Las cápsulas que contienen 119.5 mg del compuesto llamado en el título (= SAL I) corresponde a 100 mg del Compuesto I (base libre) como sustancia activa se prepara en la siguiente composición:

10

15

20

Composición

SAL I	119.5 mg
Avicel	200 mg
PVPPXL	15 mg
Aerosil	2 mg
Estearato de magnesio	1.5 mg
	338 mg

Las cápsulas se preparan al mezclar los componentes y llenar cápsulas de gelatina dura con la mezcla, tamaño 1.

25

30

35

40

45

50

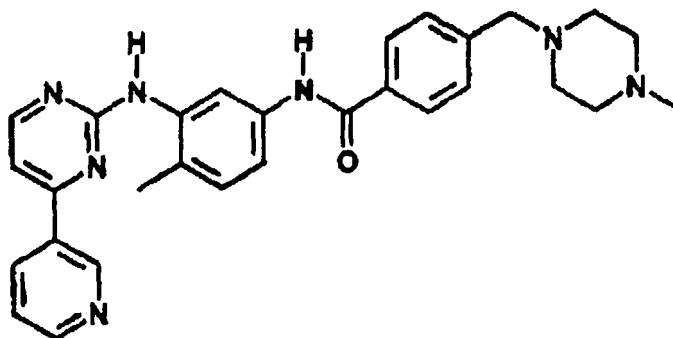
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación para uso simultáneo, separado o secuencial que comprende (a) un inhibidor quina-
sa dependiente de ciclina y (b) 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-
benzamida que tiene la fórmula I



(I)

en el que los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farma-
céuticamente aceptable, y opcionalmente, por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable, para la preparación
de un medicamento en el tratamiento de leucemia Bcr/Abl-positiva que es resistente a un compuesto de fórmula I.

2. Uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la leucemia Bcr/Abl-positiva resistente a
compuesto de fórmula I sobreexpresa Bcr/Abl.

3. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en donde el inhibidor de quinasa dependiente
de ciclina se selecciona del grupo que consiste en derivados basados en purina, derivados basados en pirimidina,
bencenosulfonamidas flavonoides, derivados de tiazol, derivados de paulonas, derivados de estaurosporina, derivados
de indigoid bisindol, butirolactona 1, compuestos de pirazolopiridina, derivados de indol, y compuestos de amino-
pirazol.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina es flavopiridol o
E 7070 o CYC 202.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el inhibidor de quinasa dependiente
de ciclina es flavopiridol.

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 en donde el flavopiridol y 4-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-N-[4-metil-3-
(4-piridin-3-il)pirimidin-2-ilamino]fenil]-benzamida están presentes en una proporción molar efectiva sinérgicamente
(FP/Compuesto I) en el rango de 1:1 a 1:10.

7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los ingredientes activos (a) y
(b) están presentes en una cantidad efectiva sinérgicamente.