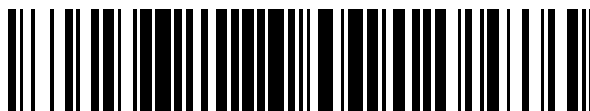


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 801**

51 Int. Cl.:
A01N 43/02 (2006.01)
A61K 31/335 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08745749 .5**
96 Fecha de presentación: **14.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2136631**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Procedimiento para el tratamiento de la neoplasia con una combinación de agentes quimioterápicos y radiación**

30 Prioridad:
14.04.2007 US 911874 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2012

73 Titular/es:
**SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
OFFICE OF COMMERCIALIZATION AND
INTELLECTUAL PROPERTY 2000 9TH AVENUE
SOUTH P.O. BOX 55305
BIRMINGHAM, ALABAMA 35205, US**

72 Inventor/es:
XU, BO

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 390 801 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

Procedimientos para el tratamiento de la neoplasia con una combinación de agentes quimioterápicos y radiación.

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere generalmente a los campos de la biología molecular, la oncología de radiación y la terapia del cáncer. Más específicamente, la presente descripción se refiere al descubrimiento de que una combinación de una determinada quimioterapia molecular y el tratamiento de radiación mejora los efectos terapéuticos contra el cáncer.

Antecedentes

El cáncer es un problema mundial que afecta a millones de personas cada año. Por lo tanto, la búsqueda de procedimientos para su tratamiento es de vital interés. Tanto la quimioterapia como la radiación se utilizan en el tratamiento del cáncer. La quimioterapia se refiere a la utilización de compuestos químicos o fármacos en el tratamiento de la enfermedad, aunque el término quimioterapia está más asociado con frecuencia al tratamiento del cáncer. Los agentes quimioterápicos contra el cáncer también se denominan comúnmente agentes antineoplásicos. Los efectos secundarios graves experimentados con la mayoría de quimioterápicos contra el cáncer son un resultado de la naturaleza no específica de estos fármacos, que no distinguen entre células sanas y cancerosas, y en lugar de eso destruyen ambas. Los fármacos específicos del ciclo celular intentar disminuir estos efectos, dirigiéndose a las fases del ciclo celular que participan en la multiplicación y división celular. Estos fármacos, sin embargo, no distinguen entre células cancerosas y células sanas que están experimentando la división celular normal. Las mayoría de las células en situación de riesgo de estos tipos de quimioterapia son los que a menudo experimentan la división celular, incluyendo las células sanguíneas, células del folículo piloso y las células de los tubos reproductivo y digestivo.

Los efectos secundarios más comunes de los agentes quimioterápicos son las náuseas y los vómitos. Una gran proporción de individuos sufren también de mielosupresión, o supresión de la médula ósea, que produce glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Estos y otros efectos secundarios empeoran también por la supresión del sistema inmunitario concomitante con la destrucción y la falta de producción de glóbulos blancos de la sangre, y el riesgo asociado de infección oportunista. Otros efectos secundarios comunes a una amplia gama de agentes quimioterápicos incluyen la pérdida del cabello (alopecia), pérdida de apetito, pérdida de peso, alteraciones del gusto, estomatitis y esofaguitis (inflamación y úlceras), estreñimiento, diarrea, fatiga, lesión cardíaca, alteraciones del sistema nervioso, lesión pulmonar, daños en los tejidos reproductivos, daños en el hígado, los riñones y el sistema urinario.

La radiación es otro tratamiento utilizado común para el cáncer, que se utiliza en aproximadamente el 60% de los regímenes de tratamiento. A menudo combinada con quimioterapia y/o cirugía, la radioterapia comprende tanto la administración en el cuerpo local y total, así como una serie de nuevos avances, incluyendo la radioinmunoterapia. El efecto citotóxico de la radiación sobre las células neoplásicas surge de la capacidad de la radiación para causar una rotura en una o ambas cadenas de la molécula de ADN dentro de las células. Las células en todas las fases del ciclo celular son sensibles a este efecto. Sin embargo, el daño al ADN es más probable que sea letal en las células cancerosas, ya que son menos capaces de reparar el daño del ADN. Las células sanas, con el funcionamiento de proteínas de control del ciclo celular y enzimas de reparación es mucho más probable que sean capaces de reparar el daño de la radiación y funcionan normalmente después del tratamiento.

Los efectos secundarios de la radiación son similares a los de la quimioterapia y surgen por la misma razón, el daño de tejido sano. La radiación está normalmente más localizada que la quimioterapia, pero el tratamiento está todavía acompañado de daños al tejido anteriormente sano. Muchos de los efectos secundarios son desagradables, y la radiación también comparte con la quimioterapia la desventaja de ser mutágena, carcinógena y teratógena en su propio derecho. Mientras que las células normales por lo general comienzan a recuperarse de tratamiento en dos horas de tratamiento, pueden producirse mutaciones en los genes de las células sanas. Estos riesgos son elevados en determinados tejidos, tales como los del sistema reproductivo. Además, se ha observado que diferentes personas toleran la radiación de manera diferente. Las dosis que no pueden conducir a nuevos tipos de cáncer en un individuo pueden de hecho generar más cánceres en otro individuo. Esto podría ser debido a mutaciones preexistentes en proteínas de control del ciclo celular o enzimas de reparación, pero la práctica actual no sería capaz de predecir a qué dosis un individuo concreto está en situación de riesgo. Los efectos secundarios comunes de la radiación incluyen irritación de la vejiga, fatiga, diarrea, recuentos sanguíneos bajos, irritación de la boca, alteración del gusto, pérdida de apetito, alopecia, irritación de la piel, cambios en la función pulmonar, enteritis, trastornos del sueño y otros.

El tratamiento quimioterápico y una radioterapia puede combinarse en el tratamiento de cánceres, pero a menudo el paciente sufre un mayor riesgo debido a los efectos secundarios acumulativos y a la toxicidad de cada tratamiento. Un efecto sinérgico permite una menor exposición a agentes quimioterápicos tóxicos y a la radioterapia, reduciendo de este modo los efectos secundarios, mientras que se consigue un resultado beneficioso mejorado.

Bonate *et al.*, 2006 dan a conocer la clofarabina y los análogos nucleosídicos relacionados en el tratamiento del cáncer. La patente US nº 5.585.363 sugiere la combinación de determinados análogos nucleosídicos para eludir la resistencia de las células tumorales humanas a agentes dañinos del ADN.

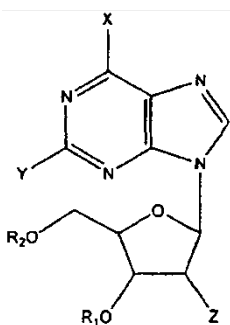
5

Sumario

La descripción se refiere en general a procedimientos para aumentar la radiosensibilidad de las células y también a procedimientos de tratamiento de cánceres con un compuesto o compuestos de la presente descripción en combinación con la radioterapia.

10

La presente descripción se refiere a un procedimiento para conferir sensibilidad a la radiación en una célula tumoral que comprende administrar a dicha célula un compuesto de fórmula (I) combinado con radiación ionizante:



Fórmula (I)

15

en la que

X e Y son iguales o diferentes y son hidrógeno, halógeno, OR₃, SR₃, NR₃R₄ o NHacilo;

20

Z es un halógeno o CF₃.

R₃ y R₄ son iguales o diferentes y son hidrógeno, un alquilo inferior de 1 a 7 átomos de carbono, un compuesto aralquilo seleccionado de entre el grupo constituido por bencilo, bencihidrido o metoxibencilo, o un compuesto de arilo seleccionado de entre el grupo constituido por fenilo, clorofenilo, toluilo, metoxifenilo y naftilo;

25

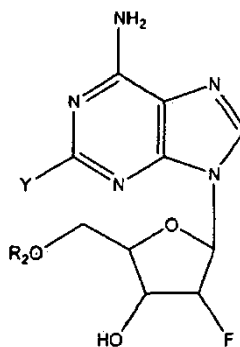
siendo NHacilo alcanoil o aroíl amida, siendo alcanoil un radical alquil carbonilo en el que el alquilo es un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, y

30

R₁ y R₂ son iguales o diferentes y son hidrógeno, acilo o aroíl, siendo acilo un grupo alcanoil de 1 a 20 átomos de carbono y siendo aroíl benzoíl o naftoíl; y sales o solvatos de los mismos.

Otra forma de realización de la presente descripción se refiere a un procedimiento para conferir sensibilidad a la radiación en una célula tumoral que comprende administrar a dicha célula un compuesto de fórmula (Ia) en combinación con radiación ionizante:

35



Fórmula (I-a)

en la que

40

Y es F, Cl, o Br;
R₂ es hidrógeno o acilo, y sales o solvatos de los mismos.

Otra forma de realización se refiere a procedimientos para aumentar la radiosensibilidad de las poblaciones de células que comprende exponer dicha poblaciones de células a una cantidad sensibilizante de un compuesto de fórmula (I) en combinación con la radiación ionizante. También se dan a conocer en la presente memoria, los procedimientos para tratar el crecimiento tumoral que comprenden administrar a un paciente que necesita el mismo una combinación sinérgica de radiación y un compuesto de fórmula (I). Todos los procedimientos dados a conocer en la presente memoria comprenden la administración de compuestos de fórmula (I), simultáneamente con la radiación en todo el curso del tratamiento. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar diariamente durante un período antes, después o durante todo el ciclo de la radioterapia. En una forma de realización, un compuesto de fórmula (I) se administra después de dirigir la radioterapia pero lo suficientemente próximo en el tiempo como para presentar un efecto combinatorio o sinérgico. Del mismo modo, un compuesto de fórmula (I) se pueden administrar antes de dirigir la radioterapia, pero lo suficientemente próximo en el tiempo como para presentar un efecto combinatorio o sinérgico.

Los cánceres tratables por los métodos dados a conocer en la presente memoria incluyen un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un cáncer pancreático, un cáncer de hígado, cánceres de tejidos blandos, un cáncer cerebral, un cáncer cabeza y cuello, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un linfoma, un sarcoma, un cáncer melanoma del cuello uterino y del endometrio, un cáncer de vejiga, un cáncer renal o un cáncer ocular.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una fotografía al microscopio de inmunofluorescencia que muestra la detección de los focos H2AX inducidos por radiación y de células tratadas con diferentes concentraciones de clofarabina.

La figura 2 es un gráfico que muestra los focos nucleares H2AX por y media por núcleo de las células irradiadas tratadas con diferentes concentraciones de clofarabina.

La figura 3 muestra las curvas de supervivencia para las fracciones de células tratadas con clofarabina solamente y para las fracciones de células tratadas tanto con clofarabina como con irradiación.

La figura 4 presenta gráficos que comparan la actividad de radiosensibilización de clofarabina, gemcitabina y fluorouracilo ("5-FU").

La figura 5 ilustra gráficamente el cambio medio en el peso del tumor de tumores *in vivo* tratados con clofarabina sola, radiación sola y una combinación de radiación y clofarabina.

La figura 6 ilustra gráficamente el cambio medio en el peso del tumor de tumores *in vivo* tratados con 5-FU solo, clofarabina sola, radiación sola, una combinación de radiación y 5-FU y una combinación de radiación y clofarabina.

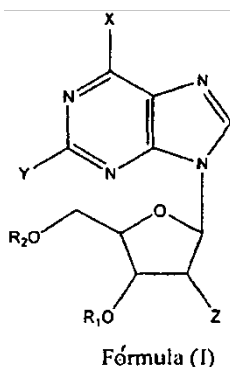
La figura 7 muestra el efecto sinérgico de la radiación y clofarabina utilizadas conjuntamente una con otra y compara los resultados con el efecto aditivo esperado.

La figura 8 muestra el efecto antitumoral de clofarabina sobre células SKOV-3.

La figura 9 muestra el efecto antitumoral de clofarabina sobre células IGROV-1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I) para la administración en combinación con radiación ionizante para su utilización en el tratamiento del crecimiento del tumor



en la que

X e Y son iguales o diferentes y son hidrógeno, halógeno, OR₃, SR₃, NR₃R₄ o NHacilo;

Z es un halógeno o CF₃.

R₃ y R₄ son iguales o diferentes y son hidrógeno, un alquilo inferior de 1 a 7 átomos de carbono, un compuesto aralquilo seleccionado de entre el grupo constituido por bencilo, bencihidrido o metoxibencilo, o un compuesto de arilo seleccionado de entre el grupo constituido por fenilo, clorofenilo, toluilo, metoxifenilo y naftilo;

siendo NHacilo alcanoil o aroíl amida, siendo alcanoil un radical alquil carbonilo en el que el alquilo es un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, y

R₁ y R₂ son iguales o diferentes y son hidrógeno, acilo o aroilo, siendo acilo un grupo alcanoil de 1 a 20 átomos de carbono y siendo aroilo benzoilo o naftoil; y sales o solvatos de los mismos.

Como se utilizó anteriormente y a lo largo de la descripción, los términos siguientes, a menos que se indique lo contrario, debe apreciarse que tienen los siguientes significados.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las terminologías "células neoplásicas", "neoplasia", "tumor", "células tumorales", "cáncer" y "células de cáncer" se utilizan indistintamente y se refieren a células que presentan un crecimiento relativamente autónomo, por lo que presentan un fenotipo de crecimiento anormal caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. Las células neoplásicas pueden ser malignas o benignas.

Las terminologías "agente antineoplásico", "agente quimioterápico antineoplásico", "agente quimioterápico", "antineoplásico" y "quimioterápico" se utilizan indistintamente y se refieren a compuestos químicos o medicamentos que se utilizan en el tratamiento de cáncer por ejemplo, para destruir las células cancerosas y/o disminuir la propagación de la enfermedad.

"Terapia de radiación" es una expresión comúnmente utilizada en la técnica para referirse a múltiples tipos de radioterapia, incluyendo la radioterapia interna y externa, la radioinmunoterapia, y su utilización de varios tipos de radiación incluyendo los rayos X, rayos gamma, partículas alfa, partículas beta, fotones, electrones, neutrones, radioisótopos y otras formas de radiación ionizante. Tal como se utiliza en la presente memoria, las terminologías "radioterapia" y "radiación" incluyen todos estos tipos de radioterapia, a menos que se especifique lo contrario.

Las expresiones, "supresión del crecimiento del tumor", "tratamiento del crecimiento del tumor", y "tratamiento del cáncer" y similares se refieren a la reducción de la tasa de crecimiento de un tumor, a la interrupción del crecimiento del tumor completamente, provocando una regresión en el tamaño de un tumor existente, a la erradicación de un tumor existente y/o a la prevención de la aparición de tumores adicionales durante el tratamiento con las composiciones, kits o procedimientos de la presente memoria. "Supresión" del crecimiento tumoral hace referencia a un estado de crecimiento que es restringido en comparación con el crecimiento sin la administración de un compuesto descrito en la presente memoria junto con la radiación. El crecimiento de células tumorales se puede evaluar por cualesquier medios conocidos en la técnica, que comprenden de manera no limitativa, la medición del tamaño del tumor, la determinación de si las células tumorales están proliferando utilizando un ensayo de incorporación de ³H-timidina, o recuento de células tumorales. "Supresión" del crecimiento de células tumorales significa cualquiera de o todos los siguientes estados: ralentización, retraso e interrupción del crecimiento del tumor, así como la reducción del tumor.

"Retrasar el desarrollo" de un tumor significa aplazar, dificultar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad. Este retraso puede ser de longitudes variables de tiempo, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del paciente tratado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "sinergia" o "efecto sinérgico" cuando se refiere a la administración de la combinación de un compuesto de la presente descripción junto con radiación significa que el efecto de la combinación es más que aditivo cuando se compara con la administración del compuesto o compuestos y la radiación sola.

"Un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

"Cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto como se describe en la presente memoria que puede ser terapéuticamente eficaz para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la presente descripción. La cantidad exacta de estos compuestos requeridos variará con cada uno de los compuestos o derivados empleados, la edad y estado del sujeto que debe ser tratado y la naturaleza y gravedad de la afección. Sin embargo, la cantidad eficaz puede ser determinada por cualquier experto en la materia con experimentación de rutina solamente. Cualquier experto en la materia puede determinar sin excesiva experimentación una cantidad eficaz de radiación. Los parámetros de la radiación, tales como la cantidad y la frecuencia de dosificación son bien conocidos en la técnica.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formulaciones que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para entrar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas con una razonable relación beneficio/riesgo.

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica convirtiendo en ácidas o básicas las sales de los mismos. Los compuestos de esta descripción forman sales de adición de ácido y de base con una amplia variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos y bases e incluye las sales fisiológicamente aceptables que se utilizan a menudo en química farmacéutica. Dichas sales también forman parte de esta descripción. Los ácidos inorgánicos típicos utilizados para formar tales sales incluyen clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, hipofosfórico y similares. También se pueden utilizar sales procedentes de ácidos orgánicos, tales como los ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcónicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos e hidroxialcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Dichas sales farmacéuticamente aceptables incluyen acetato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, ascorbato, benzoato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftalen-2-benzoato, bromuro, isobutirato, fenilbutirato, β -hidroxibutirato, butino-1,4-dioato, hexino-1,4-dioato, caprate, caprilato, cloruro, cinamato, citrato, formiato, fumarato, glicolato, heptanoato, hipurato, lactato, malato, maleato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, isonicotinato, nitrato, oxalato, ftalato, teraftalato, fosfato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, metafosfato, pirofosfato, propiolato, propionato, fenilpropionato, salicilato, sebacato, succinato, suberato, sulfato, bisulfato, piro-sulfato, sulfito, bisulfito, sulfonato, benceno-sulfonato, p-bromobencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etansulfonato, 2-hidroxietansulfonato, metansulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, p-toluensulfonato, xilensulfonato, tartrato y similares.

Las bases utilizadas normalmente para la formación de sales incluyen hidróxido de amonio e hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, carbonatos, así como aminas alifáticas y primarias, secundarias y terciarias y diaminas alifáticas. Las bases especialmente útiles en la preparación de sales de adición incluyen el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio, metilamina, dietilamina y etilendiamina.

"Paciente" se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos.

"Metabolito" se refiere a cualquier sustancia que resulta de cambios químicos implicados en los procesos de crecimiento y reparación en un organismo vivo, incluyendo los procesos anabólicos y catabólicos.

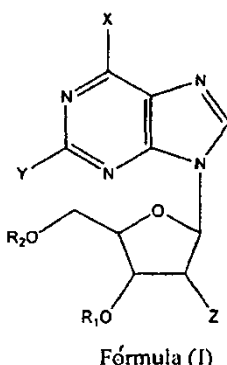
Un "profármaco" es un compuesto que se convierte dentro del cuerpo en su forma activa que tiene un efecto médico. Los profármacos pueden ser útiles cuando el fármaco activo puede ser demasiado tóxico para administrar de forma generalizada, el fármaco activo apenas se absorbe en el tubo digestivo o el cuerpo descompone el fármaco activo antes de que alcance su objetivo. Los procedimientos de fabricación de profármacos están descritos en Hans Bundgaard, Design of Prodrugs (Elsevier Science Publishers BV, 1985), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

"Solvato" se refiere al compuesto formado por la interacción de un disolvente y un soluto e incluye los hidratos. Los solvatos son generalmente aductos sólidos cristalinos que contienen moléculas de disolvente dentro de la estructura cristalina, ya sea en proporciones estequiométricas o no estequiométricas.

El término "que comprende" (y sus variaciones gramaticales) tal como se utiliza en la presente memoria se utiliza en el sentido exclusivo de "que presenta" o "que incluye" y no en el sentido exclusivo de "constituido solamente por". El término "constituido esencialmente por" como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a incluir lo que está explícitamente enumerado junto con lo que no afecta materialmente a las características básicas y nuevas de lo que se enumera o especifica.

En las fórmulas descritas y reivindicadas en la presente memoria, se pretende que cuando cualquier símbolo aparece más de una vez en una fórmula o sustituyente concreto, su significado en cada caso es independiente del otro.

La presente descripción se refiere a un procedimiento para potenciar el tratamiento de radioterapia en el tratamiento del crecimiento del tumor, que comprende administrar a un paciente necesitado del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) en combinación con radiación ionizante:



en la que

X e Y son iguales o diferentes y son hidrógeno, halógeno, OR₃, SR₃, NR₃R₄ o NHacilo;

Z es un halógeno o CF₃.

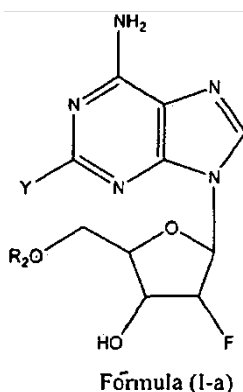
R₃ y R₄ son iguales o diferentes y son hidrógeno, un alquilo inferior de 1 a 7 átomos de carbono, un compuesto aralquilo seleccionado de entre el grupo constituido por bencilo, bencihidrido o metoxibencilo, o un compuesto de arilo seleccionado de entre el grupo constituido por fenilo, clorofenilo, toluilo, metoxifenilo y naftilo;

siendo NHacilo alcanoil o aroíl amida, siendo alcanoil un radical alquil carbonilo en el que el alquilo es un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono, y

R₁ y R₂ son iguales o diferentes y son hidrógeno, acilo o aroíl, siendo acilo un grupo alcanoil de 1 a 20 átomos de carbono y siendo aroíl benzoíl o naftoil; y sales o solvatos de los mismos. Otra forma de realización de la presente descripción se refiere a un método para conferir sensibilidad a la radiación en una célula tumoral que comprende administrar a dicha célula un compuesto de fórmula (I-a) en combinación con radiación ionizante. En otra forma de realización, las células tumorales que están sensibilizadas a la radiación no son cualquiera ni todas las células del tumor de próstata, de pulmón o de glioblastoma.

Los procedimientos de síntesis de compuestos de fórmula (I) son bien conocidos en la técnica y se describen en la patente US nº 4.751.221 de Watanabe *et al.*

Otra forma de realización de la presente descripción se refiere a un procedimiento para potenciar la radioterapia en el tratamiento de crecimiento del tumor que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I-a) en combinación con radiación ionizante:



en la que

Y es F, Cl, o Br;

R₂ es hidrógeno o acilo, y sales o solvatos de los mismos.

Otra forma de realización de la presente descripción se refiere a un método para conferir sensibilidad a la radiación en una célula tumoral que comprende administrar a dicha célula un compuesto de fórmula (I-a) en combinación con radiación ionizante. En otra forma de realización, las células tumorales que están sensibilizadas a la radiación no son cualquiera ni todas las células tumorales de próstata, de pulmón o de glioblastoma.

Los procedimientos de síntesis de compuestos de fórmula (I-a) son bien conocidos en la técnica y están descritos en

la patente US nº 6.949.640 de Montgomery *et al.*, y en la patente US nº 5.034.518 de Montgomery *et al.*, ambas asignadas a Southern Research Institute, el cesionario de esta solicitud.

5 Los procedimientos para mejorar la radiosensibilidad de poblaciones de células comprenden exponer dicha poblaciones de células a una cantidad sensibilizante de un compuesto de la presente descripción. También se dan a conocer en la presente memoria, procedimientos para el tratamiento del crecimiento tumoral que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una combinación sinérgica de radiación y un compuesto de la presente descripción. Todos los procedimientos descritos en la presente memoria pueden comprender la administración de compuestos de la presente descripción simultáneamente con la radiación en todo el curso del tratamiento. Por ejemplo, los compuestos de la presente descripción se pueden administrar diariamente durante un período antes, después o durante el ciclo de radioterapia. En una forma de realización, un compuesto de la presente descripción se administra después de dirigir la radioterapia, pero lo suficientemente próximo en el tiempo como para presentar un efecto combinatorio o sinérgico. Del mismo modo, un compuesto de la presente descripción se pueden administrar antes de dirigir la radioterapia, pero lo suficientemente cerca en el tiempo como para presentar un efecto combinatorio o sinérgico. En una forma de realización, los procedimientos de la presente descripción no están dirigidos a cualquiera ni a todos los tumores de próstata, de pulmón o de glioblastoma.

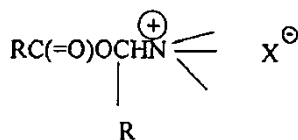
20 Los cánceres tratables por los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen un cáncer de colon, un cáncer de hígado, una cáncer colorrectal, un cáncer pancreático, cánceres de tejidos blandos, un cáncer de cerebro, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un linfoma, un sarcoma, un cáncer melanoma del cuello uterino y del endometrio, un cáncer de vejiga, un cáncer renal, o un cáncer ocular.

25 Las formas de profármaco de los compuestos portadoras diversas funciones de nitrógeno (amino, hidroxiamino, amida, etc.) pueden incluir los siguientes tipos de derivados en los que cada grupo R individualmente puede ser hidrógeno, alquilo sustituido o insustituido, alquilo, alquenilo, arilo, alquinilo, heterociclo, arilo, aralquilo, aralquenilo, aralquinilo, cicloalquilo o cicloalquenilo tal como se definieron anteriormente.

- 30 (a) Carboxamidas, -NHC(O)R
 (b) Carbamatos, -NHC(O)OR
 (c) Carbamatos de (aciloxi)alquilo, NHC(O)OROC(O)R
 (d) Enaminas, -NHCR(=CHCO₂R) o -NHCR(=CHCONR₂)
 (e) Bases de Schiff, -N=CR₂
 35 (f) Bases de Mannich (a partir de compuestos de carboximida), RCONHCH₂NR₂

40 Las preparaciones de dichos derivados de profármacos se exponen en diversas fuentes bibliográficas (son ejemplos: Alexander *et al.*, *J. Med. Chem.* 1988, 31, 318; Aligas-Martin *et al.*, PCT WO pp/41531, pág. 30). La función nitrógeno convertida al preparar estos derivados es uno (o más) de los átomos de nitrógeno de un compuesto de la invención.

45 Las formas profármaco de compuestos de la invención que llevan carboxilo incluyen ésteres (-CO₂R) en la que el grupo R corresponde a cualquier alcohol cuya liberación en el cuerpo por procesos enzimáticos o hidrolíticos sería a concentraciones farmacéuticamente aceptables. Otra profármaco derivado de una forma de ácido carboxílico de la invención puede ser una sal cuaternaria de tipo



de estructura descrita por Bodor *et al.*, *J. Med. Chem.* 1980, 23, 469.

50 Debe apreciarse que los compuestos de la presente invención se refieren a todos los isómeros ópticos y estereoisómeros en los diversos átomos posibles de la molécula.

55 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen los derivados de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, p-toluen-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metansulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalen-2-sulfónico, trifluoroacético y bencensulfónico. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen álcalis tales como sodio y amoníaco.

60 Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse por los expertos en la materia, a partir de la presente descripción sin experimentación indebida. Los procedimientos están disponibles en la bibliografía química adecuada para preparar los azúcares o nucleósidos necesarios. A lo largo de estas líneas, véase Choi, Jong-Ryoo; Kim,

Jeong-Min; Roh, Kee-Yoon; Cho, Dong-Gyu; Kim, Jae-Hong; Hwang, Jae-Taeg; Cho, Woo-Young; Jang, Hyun-Sook; Lee, Chang-Ho; Choi, Tae-Saeng; Kim, Chung-Mi; Kim, Yong-Zu; Kim, Tae-Kyun; Cho, Seung-Joo; Kim, Gyoung-Won PCT Int. Appl. (2002), 100 pp. WO 0257288 A1 20020725 . Holy, Antonin; Votruba, Ivan; Tloustova, Eva; Masojdkova, Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (2001), 66(10), 1545-1592. Rejman, Dominik; Masojdkova, Milena; De Clercq, Eric; Rosenberg, Ivan Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids (2001), 20(8), 1497-1522; Ubasawa, Masaru; Sekiya, Kouichi PCT Int. Appl. (2001), 39 pp WO 0164693 A1 20010907. Otmar, Miroslav; Masojdkova, Milena; Votruba, Ivan; Holy, Antonin. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (2001), 66(3), 500-506. Michal; Hocek, Michal; Holy, Antonin. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (2000), 65(8), 1357-1373. Jeffery, A. L.; Kim, J.-H.; Wiemer, D. F. Tetrahedron (2000), 56(29), 5077-5083. Holy, Antonin; Guenter, Jaroslav; Dvorakova, Hana; Masojdkova, Milena; Andrei, Graciela; Snoeck, Robert; Balzarini, Jan; De Clercq, Erik. Journal of Medicinal Chemistry (1999), 42(12), 2064-2086. Janeba, Zlatko; Holy, Antonin; Masojdkova, Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (2001), 66(9), 1393-1406. Holy, Antonin; Guenter, Jaroslav; Dvorakova, Hana; Masojdkova, Milena; Andrei, Graciela; Snoeck, Robert; Balzarini, Jan; De Clercq, Erik. Journal of Medicinal Chemistry (1999), 42(12), 2064-2086. Dang, Qun; Erion, Mark D.; Reddy, M. Rami; Robinson, Edward D.; Kasibhatla, Srinivas Rao; Reddy, K. Raja. PCT Int. Appl. (1998), 126 pp WO 9839344 A1 19980911. Arimilli, Murty N.; Cundy, Kenneth C.; Dougherty, Joseph P.; Kim, Choung U.; Oliyai, Reza; Stella, Valentino J. PCT Int. Appl. (1998), 74 pp WO 9804569. Sekiya, Kouichi; Takashima, Hideaki; Ueda, Naoko; Kamiya, Naohiro; Yuasa, Satoshi; Fujimura, Yoshiyuki; Ubasawa, Masaru. Journal of Medicinal Chemistry (2002), 45(14), 3138-3142. Ubasawa, Masaru; Sekiya, Kouichi; Takashima, Hideaki; Ueda, Naoko; Yuasa, Satoshi; Kamiya, Naohiro. Eur. Pat. Appl. (1997), 56 pp EP 785208 A1 19970723. Hocek, Michal; Masojdkova, Milena; Holy, Antonin. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1997), 62(1), 136-146. Holy, Antonin; Votruba, Ivan; Tloustova, Eva; Masojdkova, Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (2001), 66(10); 1545-1592. Holy, Antonin; De Clercq, Erik Desire Alice. PCT Int. Appl. (1996), 57 pp. WO 9633200 A1 19961024. Rejman, Dominik; Rosenberg, Ivan. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1996), 61 (Spec. Issue), S122-S123. Holy, Antonin; Dvorakova, Hana; Jindrich, Jindrich; Masojdkova, Milena; Budesinsky, Milos; Balzarini, Jan; Andrei, Graciela; De Clercq, Erik. Journal of Medicinal Chemistry (1996), 39(20), 4073-4088. Guanti, Giuseppe; Merlo, Valeria; Narisano, Enrica. Tetrahedron (1995), 51 (35), 9737-46. Takashima, Hideaki; Inoue, Naoko; Ubasawa, Masaru; Sekiya, Kouichi; Yabuuchi, Shingo Eur. Pat. Appl. (1995), 88 pp. EP 632048 A1 19950104. Alexander, Petr; Holy, Antonin; Masojdkova, Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1994), 59(8), 1853-69. Alexander, Petr; Holy, Antonin; Masojdkova, Milena; Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1994), 59(8), 1853-69. Jindrich, Jindrich; Holy, Antonin; Dvorakova, Hana. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1993), 58(7), 1645-67. Holy, Antonin. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1993), 58(3), 649-74. Guanti, Giuseppe; Merlo, Valeria; Narisano, Enrica; Tetrahedron (1995), 51 (35), 9737-46. Emishetti, Purushotham; Brodfuchrcr, Paul R.; Howell, Henry G.; Sapino, Chester, Jr. PCT Int. Appl. (1992), 43 pp. WO 9202511 A1 19920220. Glazier, Arnold. PCT Int. Appl. (1991), 131 pp. WO 9119721. Kim, Choung Un; Luh, Bing Yu; Misco, Peter F.; Bronson, Joanne J.; Hitchcock, Michael J. M.; Ghazzouli, Ismail; Martin, John C Journal of Medicinal Chemistry (1990), 33(4), 1207-13. Rosenberg, Ivan; Holy, Antonin; Masojdkova, Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1988), 53(11B), 2753-77. Rosenberg, Ivan; Holy, Antonin; Masojdkova, Milena. Collection of Czechoslovak Chemical Communications (1988), 53(11B), 2753-77.

Aunque sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que los compuestos de la presente descripción, tales como clofarabina, operan de manera sinérgica con la radioterapia por el mantenimiento de la presencia del daño en el ADN para aumentar la respuesta del tumor a la radioterapia. Las funciones de clofarabina a través de la interrupción del metabolismo de nucleótidos inhibiendo las ADN polimerasas y la ribonucleótido reductasa (RnR), una clase de enzimas necesarias para el reciclaje de la mezcla de nucleótidos. La RnR cataliza la reducción de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, proporcionando los sustratos para la síntesis y reparación del ADN. La clofarabina es fosforilada por cinasas citosólicas (desoxicitidina cinasa) a clofarabina 5'-monofosfato y por mono- y difosfocinasas a la forma activa, clofarabine 5'-trifosfato. La clofarabina 5'-trifosfato compete con trifosfato de desoxiadenosina (dATP) por la ADN polimerasa- α y - ϵ e inhibe RnR por la eliminación de mezclas de desoxirribonucleótido trifosfato de desoxicitidina trifosfato y dATP. Estas acciones culminan en la inhibición de la síntesis de ADN y tanto la inducción de roturas de cadena como la inhibición de la reparación del ADN. También es posible que la clofarabina se pueda incorporar en un parche de reparación, dar lugar a la terminación de cadena en el punto de incorporación, prolongar una señal de respuesta al daño en el ADN y producir más daños permanentes en el ADN iniciados por la radioterapia.

Los siguientes ejemplos ilustran y describen aspectos de la presente descripción. Los ejemplos muestran y describen solamente formas de realización limitadas los procedimientos descritos en los siguientes ejemplos se describen también en Cariveau *et al.*, *Clofarabine Acts as Radiosensitizer In Vitro and In Vivo by Interfering with DNA Damage Response*, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 70 (1): 213-220 (2008).

Ejemplo 1

Preparado quimioterápico

Un agente quimioterápico tal como clofarabina (2-cloro-9-(2-desoxi-fluoro- β -D-arabino-furanosil)-adenina) (Genzyme), gemcitabina (Elli Lilly), o 5-FU (American Pharmaceutical Partners) se disuelve en DMSO (sulfóxido de

dimetilo) a una concentración de solución madre de 100 mM y se almacena a -20°C. Los compuestos se redisuelven, a las diluciones de trabajo, en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) medio de cultivo que contiene suero bovino fetal, L-glutamina (2 mM) y 1% de penicilina-estreptomina inmediatamente antes de su uso.

5

Ejemplo 2

Radiación

10 Para irradiaciones, se utiliza una vitrina de irradiación X-RAD 320 (Precision X-ray, East Haven, CT) a 320 KV y 160 mA, con un filtro de 0,8 mm Sn + 0,25 mm Cu + 1,5 mm Al (HVL \cong 3,7 Cu) a un TSD de 20 cm y una dosis de 3,4 Gy/min. Todas las irradiaciones se llevan a cabo a presión atmosférica y temperatura normales.

Ejemplo 3

15

Ensayo de formación de foco γ -H2AX

20 Las células HeLa y DLD-1 (HCT15) (procedentes de ATCC, CCL-2, Manassas VA) se mantienen en crecimiento exponencial en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) con 10% de FBS (suero bovino fetal), en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Cultivos con crecimiento exponencial de células HeLa se colocan en placas sobre cubreobjetos estériles de 22 cm², en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) con 10% de FBS (suero bovino fetal), y se incuban durante 24 horas a 37°C en aire humidificado con 5% de CO₂. Las células se tratan con clofarabina 0, 5, 10, 100 ó 1000 nM, se simula o se irradia con 6 Gy, y se recogen 30 minutos después. Para los estudios de presencia focos de γ -H2AX a lo largo del tiempo, se tratan las células con clofarabina 0, 5 ó 10 nM, se simula o se irradia con 6 Gy, y se recogen a 0, 0,5, 2, 8 y 24 horas. Se utiliza inmunofluorescencia para determinar los efectos de la clofarabina en la inducción y mantenimiento de focos γ -H2AX. Se cuentan a continuación el número de focos por núcleo a partir de una población de por lo menos 25 células, y se representan la media y la desviación estándar.

25

30 Se realizó el ensayo descrito anteriormente y los resultados se muestran en la figura 1, lo que demuestra que la clofarabina prolonga la existencia de los focos γ -H2AX producidos por IR. Se trataron células HeLa con clofarabina durante una hora, se irradiaron con 0 (simulación) o 6 Gy (IR), y se recogieron a continuación. Se utilizó un microscopio de inmunofluorescencia para detectar la radiación inducida por focos γ -H2AX. La figura 2 demuestra que la clofarabina prolonga la existencia de focos γ -H2AX producidos por IR. Se determinó para cada imagen la media de focos nucleares γ -H2AX por núcleo utilizando Image Pro 5,1. Las barras de error representan ± 1 D.E. de la media de tres experimentos independientes.

35

Ejemplo 4

Ensayos de radiosensibilidad

40 Para determinar el efecto radiosensibilizante de clofarabina, se lleva a cabo un ensayo de formación de colonias utilizando una serie de dosis de clofarabina (0-1000 nM) con y sin radiación 2-Gy. Se incubaron células HeLa con clofarabina durante 4 h antes de la radioterapia. Se probó la radiosensibilidad de clofarabina y los resultados se presentan en la figura 3, que demuestra que la clofarabina aumenta la radiosensibilidad celular. Se sembraron células HeLa a diluciones restringidas y se trató con clofarabina durante 4 horas antes de la irradiación, se expuso continuamente al fármaco durante 20 horas más, se recogieron 10 a 12 días después y se tiñeron con cristal violeta. Las curvas de supervivencia con cada dato puntual que representa la media de tres experimentos independientes se muestran con las barras de error que representan ± 1 SEM.

50

Ejemplo 5

Comparación de clofarabina, gemcitabina y radiosensibilización inducida con 5-FU

55 Para comparar el potencial radiosensibilizante de clofarabina con otros antimetabolitos radiosensibilizantes probados, la radiosensibilidad se prueba en las células HeLa tratadas con una combinación de clofarabina, gemcitabina o 5-FU con radioterapia. Los agentes se administran a las mismas dosis y al programa para identificar la dosis letal media (DL₅₀) para cada fármaco. La DL₅₀ se utiliza entonces para cada agente en experimentos posteriores. La clofarabina, gemcitabina y 5-FU se ensayaron y los resultados se presentan en la figura 4. Se sembraron las células a diluciones restringidas y se trataron con clofarabina, gemcitabina o 5-FU durante 4 horas antes de la irradiación, continuamente expuestos al fármaco durante otras 20 horas, se recogieron 10 a 12 días más tarde y se tiñeron con violeta cristal. Las barras de error representan ± 1 SEM, en los gráficos son la media de tres experimentos independientes.

60

Ejemplo 6Citotoxicidad, radiosensibilidad y sinergia de quimiorradiación

- 5 Se cultivan en placas células HeLa o DLD-1 a diluciones restringidas en placas de 6 pocillos y se incuban durante 24 horas a 37°C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂. Para los ensayos de citotoxicidad, las células se tratan después con dosis de clofarabina, gemcitabina o 5-FU durante cuatro horas y se añade medio reciente 20 horas después.
- 10 Para sensibilidad a la radiación, las células se tratan con clofarabina, gemcitabina o 5-FU, se simula o se irradia con 2Gy solo, o 1-4Gy, y se cambia el medio 20 h después. Los cultivos se incuban a continuación durante 10 a 12 días, se recogen y se tiñen con violeta cristal al 0,5% en metanol. El número de colonias se determinan con un microscopio de disección. Una población de >50 células se cuenta como una colonia, y el número de colonias se expresan en porcentaje del valor de las referencias no tratadas y los tratados con clofarabina, gemcitabina o 5-FU.
- 15 Las curvas de supervivencia se representan por análisis de regresión lineal, y el valor D₀ representa la dosis de radiación que lleva al 37% de supervivencia. Las relaciones de mejora de sensibilización (SER) se calcularon a continuación según los valores D₀ que utiliza la fórmula siguiente:

$$\text{SER} = \frac{\text{Células no tratadas a } D_0}{\text{Células tratadas a } D_0}$$

- 20 El índice de combinación (IC) se utiliza entonces para determinar si la interacción es sinérgica. El índice de combinación (IC) se describe en Pauwels *et al.*, *F. Cell Cycle Effect of Gemcitabine and its Role in the Radiosensitizing Mechanism in Vitro.*, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 57:1075-1083 (2003) y Giovannetti *et al.*, Synergistic Citotoxicity and Pharmacogenetics of Gemcitabine and Pemetrexed Combination in Pancreatic Cancer Cell Lines, Clin. Cancer Res., 10:2936-2943 (2004), que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Para determinar si la interacción es sinérgica (CI ≤ 0,7), aditiva (0,7 ≤ IC ≤ 0,9) o antagonista (0,9 ≤ IC ≤ 1,1), se utilizan los cálculos siguientes:

$$\text{IC} = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2}$$

- 30 en la que (D)₁ es la mediana letal (letal para el 50% de los pacientes de la prueba) (DL₅₀) en nanomoles para el tratamiento de combinación de clofarabina con IR, (D)₂ es la DL₅₀ en Gy para el tratamiento de la combinación de clofarabina con radioterapia, (D)_{x1} y (D)_{x2} son las DL₅₀ de clofarabina y de la radioterapia sola. Relaciones de mejora del sensibilizador (SER) de clofarabina, gemcitabina o 5-FU se calculan basándose en la fracción superviviente en 2 Gy. Cada experimento se repitió por lo menos dos veces y se demuestra la significación estadística (a p>0,05) utilizando la prueba t de Student.

- 35 Se llevaron a cabo los procedimientos descritos anteriormente y los resultados se muestran en la figura 7. La figura 7 muestra el efecto sinérgico de la radiación y la clofarabina cuando se utilizan juntos y compara los resultados para el efecto aditivo esperado basado en el método descrito anteriormente.

Ejemplo 7Ensayo de xenoinjerto de cáncer de colon

- 45 Se implantan s.c. tumores DLD-1 de colon humano en ratones machos atímicos nu/nu cerca del costado derecho. Se deja que los tumores alcancen 100 a 256 mg en peso (100 a 256 mm³ de tamaño) antes del inicio del tratamiento. Se implanta a un número suficiente de ratones de modo que los tumores en un intervalo de peso tan estrecho como sea posible se seleccionan para el ensayo en el día de inicio del tratamiento (día 14 después de la implantación del tumor). Se llevan a cabo dos estudios por separado. En la primera serie de experimentos, los ratones se tratan con clofarabina sola o clofarabina más radiación a 3Gy por tratamiento para una dosis total de 18 Gy. En la segunda serie de experimentos, los ratones se tratan con clofarabina, gemcitabina o 5-FU por inyección *ip* o los fármacos más radiación a 3 Gy por tratamiento para una dosis total de 9 Gy. El volumen del tumor y el tamaño se registran a diario, y no se permite la rotura o ulceración de la piel.
- 50
- 55 Se realizó el ensayo descrito anteriormente y los resultados se proporcionan en las figuras 5 y 6. La figura 5 demuestra que la clofarabina sensibiliza los tumores a la radiación *in vivo*. Se implantaron por vía sc tumores de colon humano DLD-1 en ratones macho atímicos. Los ratones se trataron con clofarabina sola o clofarabina más radiación. La figura 6 también muestra efectos sensibilizantes a clofarabina en los tumores *in vivo*. Los ratones se trataron con clofarabina, gemcitabina o 5-FU por inyección *ip* o fármacos más radiación. El volumen del tumor y el tamaño se registraron sobre a diario. Se muestran los pesos medios del tumor de cada grupo en función del tiempo después de la implantación.
- 60

Ejemplo 8Ensayos de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello, páncreas y colon

- 5 Se utilizan modelos de xenoinjerto incluyendo DU-145 (próstata), NCI-H460 NSCL (pulmón), SF-295 CNS (glioblastoma), SR475HN (cabeza y cuello), PANC-1 (páncreas) y HCT-116 (colon) para estudiar el efecto de compuestos según la presente descripción combinado con radioterapia. Se implantan a ratones por vía subcutánea fragmentos de tumor de un pase *in vivo* y se dejan crecer los tumores. Los ratones con tumores en un intervalo de tamaño designado se seleccionan para los estudios. Los estudios NCI-H460 y SF-295 utilizan 12 Gy de radiación total suministrada en cuatro fracciones de 3 Gy cada tres días combinada con clofarabina inyectada por inyección intraperitoneal (ip) diaria durante 10 días a una dosis de 30 mg/kg/inyección. Los restantes modelos de tumor son administrados 20 Gy, en fracciones de 2 Gy al día durante cinco días, durante dos semanas en combinación con clofarabina inyectada vía ip al día durante 12 días a una dosis de 30 mg/kg/inyección.
- 10
- 15 Se utilizaron los procedimientos descritos anteriormente y los datos resultantes se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1				
Resultados para la combinación de clofarabina y radiación - Estudios <i>in vivo</i>				
Tumor	Agente	Tratamiento	Retraso del crecimiento (T-C, días)	Sobrevivientes sin tumores/Total
DU-145 (próstata)	Clofarabina	30 mg/kg/dosis, ip, d. 13-24	4,3	0/6
	Radiación	2 Gy, d. 13-17, 20-24	18,3	0/6
	Combinación*		19,8	0/6
NCI-H460 NSCL (pulmón)	Clofarabina	30 mg/kg/dosis, ip, d. 8-17	4,6	0/6
	Radiación	3 Gy, d. 8, 11, 14, 17	9,4	0/6
	Combinación*		16,9	0/6
SF-295 CNS (glioblastoma)	Clofarabina	30 mg/kg/dosis, ip, d. 8-17	-0,8	0/6
	Radiación	3 Gy, d. 8, 11, 14, 17	7,2	0/6
	Combinación*		9,5	0/6
SR475 (cabeza y cuello)	Clofarabina	30 mg/kg/dosis, ip, d. 19-30	18,2	0/6
	Radiación	2 Gy, d. 19-23, 26-30	73,2	0/6
	Combinación*		> 162,0	4/6
PANC-1 (pancreático)	Clofarabina	30 mg/kg/dosis, ip, d. 12-23	17,2	0/6
	Radiación	2 Gy, d. 12-16, 19-23	1,7	0/6
	Combinación*		63,8	0/6
HCT-116 (colon)	Clofarabina	30 mg/kg/dosis, ip, d. 13-24	24,2	0/6
	Radiación	2 Gy, d. 13-17, 20-24	29,3	0/6
	Combinación*		> 78,9	5/6

* La clofarabina se administró en primer lugar seguida de radiación 1 hora después

- 20 La clofarabina radiosensibilizó los tumores de cabeza y cuello SR475HN con valores de T-C (referidos a duplicados de 2 tumores) de 18,2, 73,2 y >162 días para la clofarabina, la radiación y la combinación, respectivamente. La clofarabina radiosensibilizó los tumores pancreáticos PANC-1 con valores de T-C (referidos a duplicados de 2 tumores) de 17,2, 1,7 y 63,8 días para la clofarabina, la radiación y la combinación, respectivamente. La clofarabina radiosensibilizó los tumores de colon HCT-116 con valores de T-C (referidos a duplicados de 3 tumores) de 24,2, 29,3 y >78,9 días para la clofarabina, la radiación y la combinación, respectivamente. La capacidad radiosensibilizante de gemcitabina fue seguida con los resultados de clofarabina. La clofarabina no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del glioblastoma SF-295 que no había mejorado con la radiación. No hubo diferencia entre la radiación sola y la radiación combinada con clofarabina en xenoinjertos DU-145 de próstata. El efecto combinado sobre los tumores de pulmón NCI-H460 parecía ser aditivo con los valores T-C (referidos en el tiempo a duplicados de 3 tumores) de 4,6, 9,4 y 16,9 días para clofarabina, la radiación, y la combinación, respectivamente. Tres de los seis modelos de tumores ensayados presentaban notable radiosensibilización con clofarabina mientras que otro modelo de tumor presentó un efecto aditivo. Dos de los seis modelos probados no presentaban pruebas de una interacción entre la clofarabina y radiación. Los datos indican una tendencia que presenta la capacidad de clofarabina para radiosensibilizar células tumorales.
- 25
- 30
- 35

Ejemplo 9 (no forma parte de la invención)Actividad antitumoral de clofarabina en células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino

- 40 Se prueba la citotoxicidad de un compuesto de la presente descripción frente a dos estirpes de células de ovario, SKOV-3 e IGROV-1. Un ensayo convencional clonógeno de supervivencia se realizó tal como el descrito en Munshi *et al.*, *Clonogenic Cell Survival Assay, Methods Mol. Med.*, 110-21-8 (2005). La clofarabina, así como el cisplatino

(utilizado como referencia para su comparación), se añaden a las células en las dosis indicadas durante 24 horas antes de retirarlos.

5 Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente y los resultados se presentan en las figuras 8 y 9. Como se aprecia en la figura 8, en las células SKOV-3, que se consideran una estirpe celular resistente a cisplatino, clofarabina presenta una destrucción significativa de células tumorales en comparación con cisplatino. La figura 9 demuestra que la clofarabina también presenta un aumento de actividad en las células IGROV-1 en comparación con cisplatino.

10 Formulaciones

Los compuestos de la presente descripción se pueden administrar por cualesquier medios convencionales disponibles para su utilización junto con productos farmacéuticos, ya sea como agentes terapéuticos solos o en una combinación de agentes terapéuticos. Se pueden administrar solos, pero generalmente se administran con un vehículo farmacéutico seleccionado sobre la base de la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica habitual.

20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la materia. El vehículo farmacéuticamente aceptable suele ser químicamente inerte a los compuestos activos y no presenta efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de utilización. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir polímeros y matrices de polímeros.

25 Los compuestos de esta descripción pueden administrarse por cualquier método convencional disponible para su utilización junto con productos farmacéuticos, ya sea como agentes terapéuticos solos o en una combinación de agentes terapéuticos.

30 La dosis administrada, desde luego, oscilará dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas de cada agente y su modo y ruta de administración, la edad, la salud y el peso del receptor, la naturaleza y alcance de los síntomas; el tipo de tratamiento simultáneo, la frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. Una dosis diaria de principio activo cabe esperar que sea de aproximadamente 0,001 a 1000 miligramos (mg) por kilogramo (kg) de peso corporal, siendo la dosis preferida de 0,1 a aproximadamente 30 mg/kg.

35 Las formulaciones (composiciones adecuadas para la administración) contienen entre aproximadamente 1 mg y 500 mg de principio activo por unidad. En estas composiciones farmacéuticas, el principio activo normalmente estará presente en una cantidad entre aproximadamente 0,5 y 95% en peso referido al peso total de la composición.

40 El principio activo puede administrarse por vía oral en formas galénicas sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas galénicas líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. También se puede administrar por vía parenteral, en formas galénicas líquidas estériles. El principio activo también puede administrarse por vía intranasal (gotas nasales) o por inhalación de una vaporización en polvo del fármaco. Otras formas galénicas son potencialmente posibles, tales como la administración por vía transdérmica, mediante el mecanismo de parche o pomada.

45 Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar constituidas por (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, bolsitas, comprimidos, pastillas y grageas, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de principio activo, en forma de sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, propilenglicol, glicerina y polietilenglicoles, ya sea con o sin adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión o un agente emulsionante. Las formulaciones en cápsula pueden ser del tipo ordinario de gelatina con cubierta dura o blanda que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formulaciones en comprimido puede incluir uno o más de los siguientes: lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y vehículos farmacológicamente compatibles. Las formulaciones en pastillas pueden comprender el principio activo en un aromatizante, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, y geles que contienen, además del principio activo, vehículos tales como los conocidos en la técnica.

65 Los compuestos de la presente descripción, solos o combinados con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones en aerosol para ser administradas por inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano y nitrógeno.

También pueden formularse en productos farmacéuticos para preparados no presurizados, tales como en un nebulizador o un atomizador.

5 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas, inyectables estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, disolventes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El compuesto se puede administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido estéril o una mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico, glicoles, tal como propilenglicol o polietilenglicol, tal como poli (etilenglicol) 400, cetales de glicerol tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-metanol, éteres, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

20 Los aceites que se pueden utilizar en las formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen los de cacahuete, soja, sésamo, algodón, maíz, oliva, vaselina y minerales. Los ácidos grasos adecuados para su utilización en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados. Los jabones adecuados para su utilización en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metales alcalinos, de amonio y de trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquilamonio, y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefinas, sulfatos y sulfosuccinatos de alquilo, olefinas, éteres y monoglicéridos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno y polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, β -aminopropionatos de alquilo y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina y (e) mezclas de los mismos.

30 Las formulaciones parenterales suelen contener entre aproximadamente 0,5% y 25% en peso de principio activo en solución. En dichas formulaciones se pueden utilizar conservantes y tampones adecuados. A fin de minimizar o eliminar la irritación en la zona de inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que presentan un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) entre aproximadamente 12 y 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones oscila entre aproximadamente 5% y 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitán y polietileno, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables son también bien conocidos por los expertos en la materia. La selección del excipiente se determinará en parte por el compuesto específico, así como por el procedimiento específico utilizado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente descripción. Los siguientes procedimientos y excipientes son proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo. Los excipientes farmacéuticamente aceptables preferentemente no interfieren con la acción de los principios activos y que no producen efectos secundarios adversos. Los vehículos y excipientes adecuados incluyen disolventes tales como agua, alcohol, y propilenglicol, absorbentes sólidos y diluyentes, agentes tensioactivos, agentes de suspensión, aglutinantes para elaboración de comprimidos, lubricantes, esencias y agentes colorantes.

50 Las formulaciones pueden presentarse en dosis unitarias o recipientes sellados de dosis múltiples, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables improvisadas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Los requisitos para vehículos farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien conocidos por cualquier experto en la materia (5, 6). Véase Banquero y Chalmers *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, 238-250 (JB Lippincott Co., Philadelphia, PA Eds. 1982) y Toissel, *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, 622-630 (4ª ed. 1986), incorporadas a la presente memoria como referencia en su totalidad.

60 Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen pastillas que comprenden el principio activo en un saborizante, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, y colutorios bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado; así como cremas, emulsiones, y geles que contienen, además del principio activo, vehículos tales como los conocidos en la técnica.

65 Además, pueden presentarse formulaciones adecuadas para administración rectal tales como supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Pueden presentarse formulaciones adecuadas para administración vaginal tales como óvulos vaginales, tampones, cremas,

geles, pastas, espumas, o fórmulas para pulverización que contienen, además del principio activo, vehículos tales como se conocen en la técnica como apropiados.

5 Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, texto de referencia habitual en este campo.

10 La dosis administrada a un animal, concretamente a un ser humano, en el contexto de la presente descripción debe ser suficiente para afectar a una respuesta terapéutica en el animal durante un periodo razonable. Un experto en la materia apreciará que la dosificación dependerá de una variedad de factores incluyendo la afección del animal, el peso corporal del animal, así como la gravedad y etapa de la enfermedad en tratamiento.

15 Una dosis adecuada es la que produzca una concentración del agente activo en un paciente que se sabe que afecta a la respuesta deseada. La dosis preferida es la cantidad que produce la inhibición máxima de la afección en tratamiento, sin efectos secundarios incontrolables.

El tamaño de la dosis también será determinado por la ruta, ritmo y frecuencia de administración, así como la existencia, naturaleza, y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar a la administración del compuesto y al efecto fisiológico deseado.

20 Las formas galénicas útiles para la administración de los compuestos según la presente descripción puede ilustrarse de la forma siguiente:

Cápsulas de cubierta dura

25 Se prepara un gran número de cápsulas unitarias rellenando cápsulas de gelatina dura convencionales de dos piezas cada una con 100 mg de principio activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa y 6 mg de estearato de magnesio.

Cápsulas de gelatina blanda

30 Se prepara una mezcla de principio activo en un aceite digerible tal como aceite de soja, aceite de semillas de algodón o aceite de oliva y se inyecta por medio de una bomba de desplazamiento positivo en gelatina fundida para formar cápsulas de gelatina blanda que contienen 100 mg del principio activo. Las cápsulas se lavan y se secan. El principio activo puede disolverse en una mezcla de polietilenglicol, glicerina y sorbitol para preparar una mezcla de la medicina miscible en agua.

Comprimidos

40 Se prepara un gran número de comprimidos por procedimientos convencionales de manera que la dosis unitaria sea 100 mg de principio activo, 0,2 mg. de dióxido de silicio coloidal, 5 mg de estearato de magnesio, 275 mg de celulosa microcristalina, 11 mg. de almidón, y 98,8 mg de lactosa. Pueden aplicarse recubrimientos acuosos y no acuosos apropiados para aumentar el sabor agradable, mejorar la vistosidad y la estabilidad o retardar la absorción.

Comprimidos/cápsulas de liberación inmediata

45 Estas son formas sólidas de dosificación oral preparadas por procedimientos convencionales y novedosos. Estas unidades se toman por vía oral sin agua para la disolución inmediata y suministro de la medicación. El principio activo se mezcla en un líquido que contiene ingredientes tales como azúcar, gelatina, pectina y edulcorantes. Estos líquidos se solidifican dentro de comprimidos sólidos o comprimidos oblongos por técnicas de liofilización y extracción en estado sólido. Los compuestos farmacéuticos pueden comprimirse con azúcares viscoelásticos y termoelásticos y polímeros o componentes efervescentes para producir matrices porosas destinadas a la liberación inmediata, sin la necesidad de agua.

50 Además, los compuestos de la presente descripción se pueden administrar en forma de gotas nasales o dosis medidas y un inhalador nasal o bucal. El fármaco se suministra en una solución nasal en forma de vaporización fina o de un polvo en forma de aerosol.

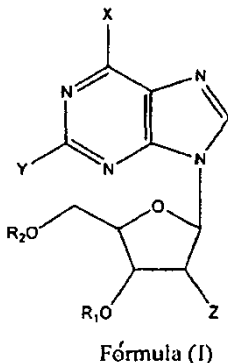
60 La descripción anterior de la invención ilustra y describe la presente descripción. Además, la descripción presenta y describe únicamente las formas de realización preferidas.

65 Las formas de realización descritas en la presente memoria están concebidas para explicar adicionalmente los mejores modos conocidos de ponerlas en práctica y para permitir a otros expertos en la materia utilizar la descripción en dichas, u otras, formas de realización y con las diversas modificaciones requeridas por las aplicaciones o usos específicos.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de Fórmula (I) para la administración en combinación con una radiación ionizante para su utilización en el tratamiento del crecimiento tumoral

5



en la que

10 X e Y son iguales o diferentes y son hidrógeno, halógeno, OR₃, SR₃, NR₃R₄ o NHacilo;

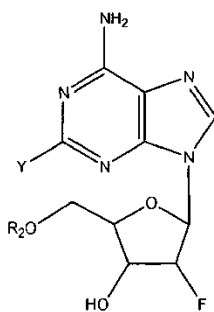
Z es un halógeno o CF₃;

15 siendo R₃ y R₄ iguales o diferentes y siendo hidrógeno, un alquilo inferior de 1 a 7 átomos de carbono, un compuesto aralquilo seleccionado de entre el grupo constituido por bencilo, bencihidrido o metoxibencilo, o un compuesto de arilo seleccionado de entre el grupo constituido por fenilo, clorofenilo, toluilo, metoxifenilo y naftilo;

20 siendo el NHacilo alcanoil o aroíl amida, siendo el alcanoil un radical alquil carbonilo en el que el alquilo es un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada saturado o insaturado que presenta de 1 a 20 átomos de carbono; y

R₁ y R₂ son iguales o diferentes y son hidrógeno, acilo o aroilo, siendo acilo un grupo alcanoil de 1 a 20 átomos de carbono y siendo aroilo benzoilo o naftoilo; y sus sales o solvatos.

25 2. Compuesto para la utilización según la reivindicación 1, en el que el compuesto de Fórmula (I) es



en la que

30 Y es F, Cl, o Br;
R₂ es hidrógeno o acilo; y sus sales y solvatos.

3. Compuesto para la utilización según la reivindicación 1, en el que R₂ es hidrógeno.

35 4. Compuesto para la utilización según la reivindicación 3, en el que el compuesto es la clofarabina.

5. Compuesto para la utilización según la reivindicación 1, en el que las células de cáncer o el crecimiento tumoral se seleccionan de entre un cáncer de colon, un cáncer de hígado, un cáncer colorrectal, un cáncer pancreático, cánceres de tejidos blandos, un cáncer cerebral, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de mama, un cáncer de ovario, un linfoma, un sarcoma, un cáncer melanoma del cuello uterino o de endometrio, un

40 cáncer de vejiga, un cáncer renal o un cáncer ocular.

6. Compuesto para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto es para la administración antes de la radioterapia.

7. Compuesto para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto es para la administración después de la radioterapia.
- 5 8. Compuesto para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el compuesto es para la administración a lo largo de un ciclo de radioterapia.
9. Compuesto para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto es para la administración diaria.

**Clofarabina provoca una presencia prolongada de focos γ -H2AX
provocados por radiación**

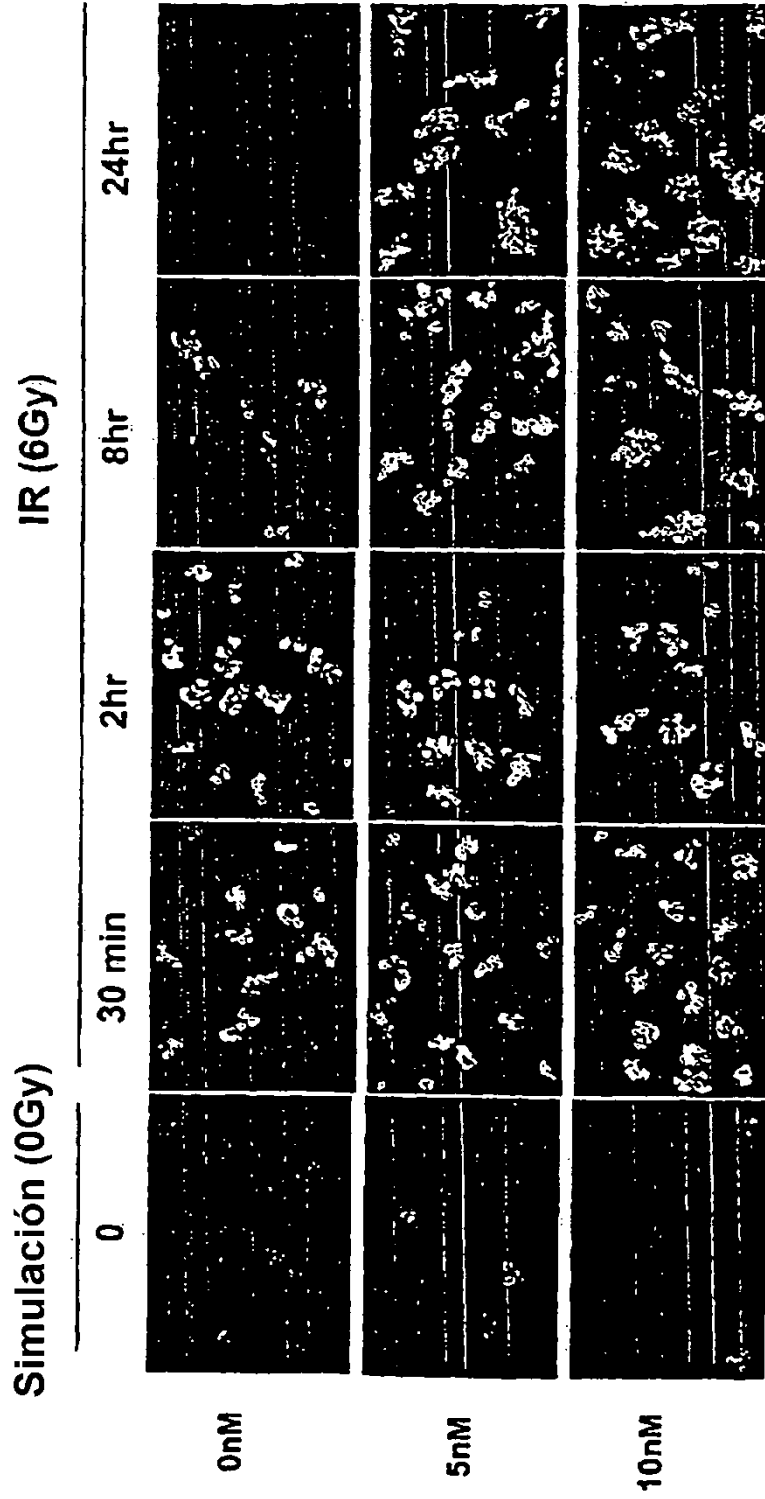


Figura 1

Clofarabina prolonga la existencia de focos γ -H2AX provocados por IR

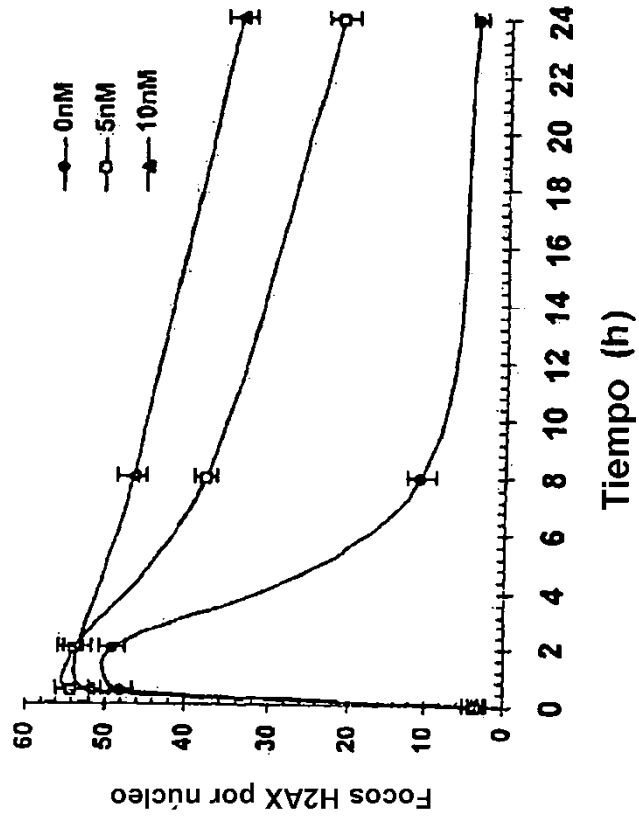


Figura 2

Clofarabina aumenta la radiosensibilidad celular

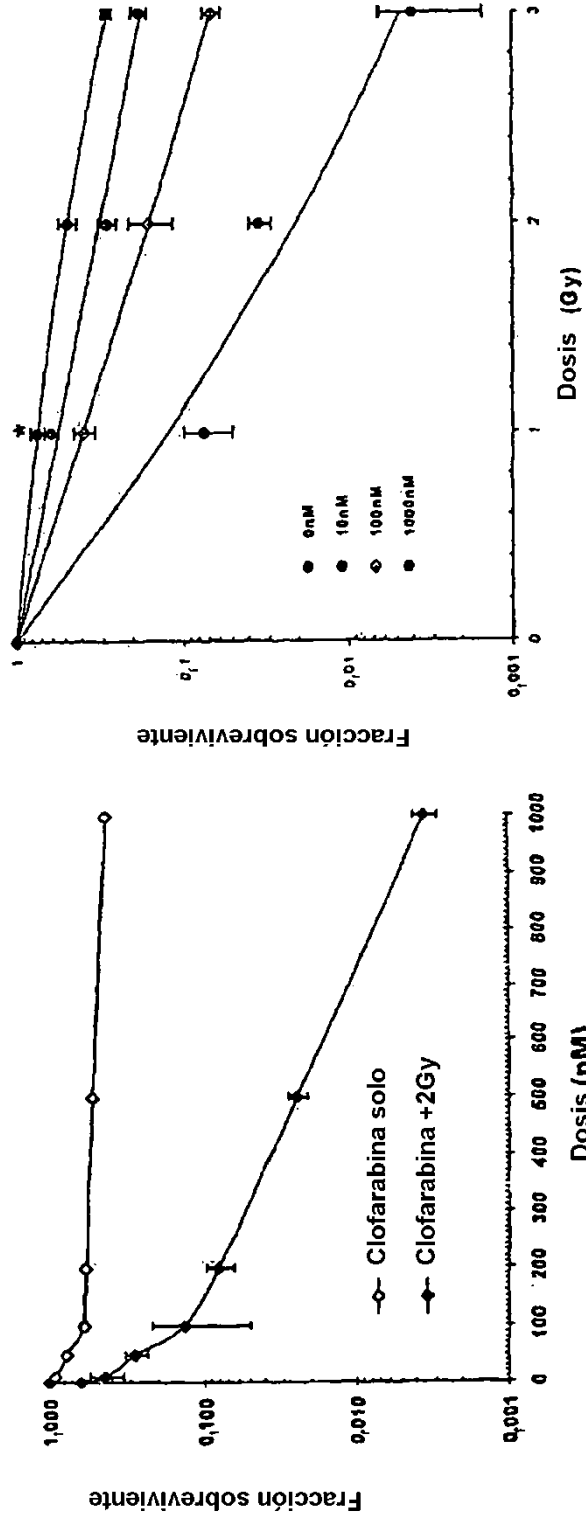


Figura 3

Comparación de la actividad radiosensibilizante de clofarabina, gemcitabina y 5-FU

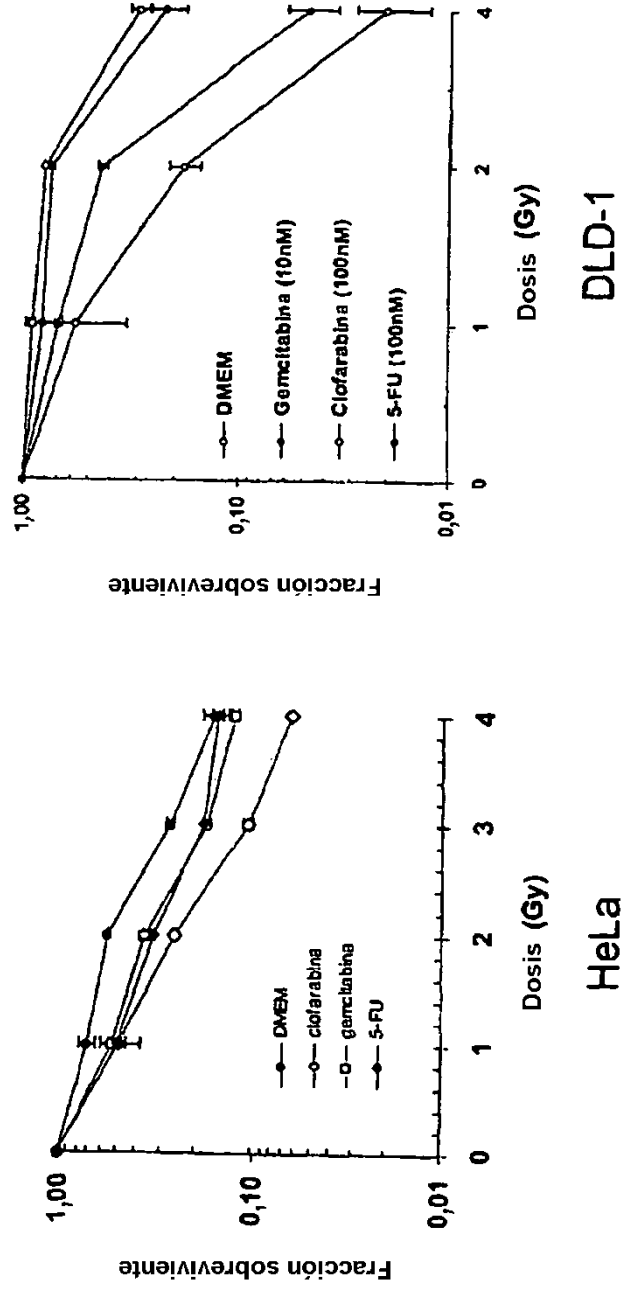


Figura 4

Actividad in vivo: estudios de xenoinjerto de tumor humano

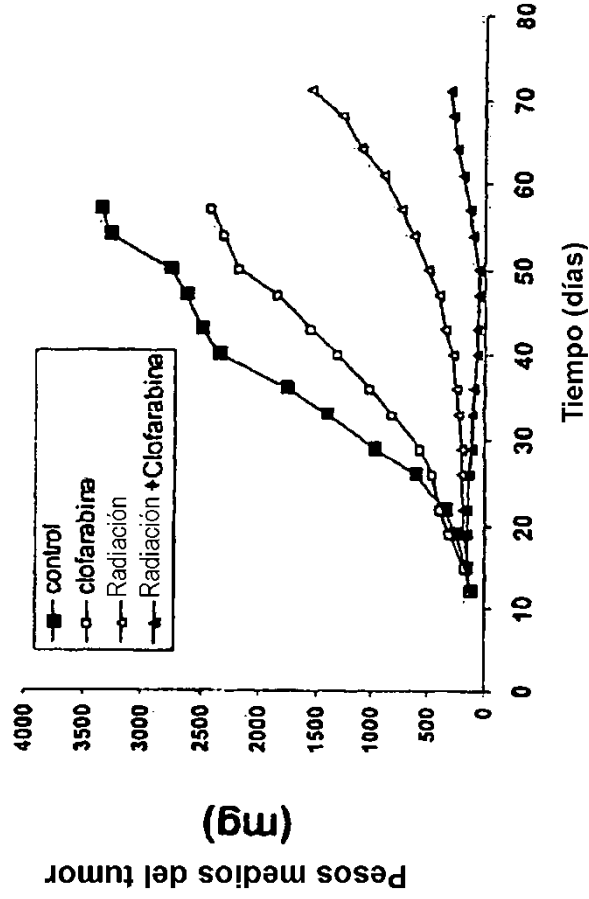


Figura 5

Actividad in vivo: estudios de xenoinjerto de tumor humano

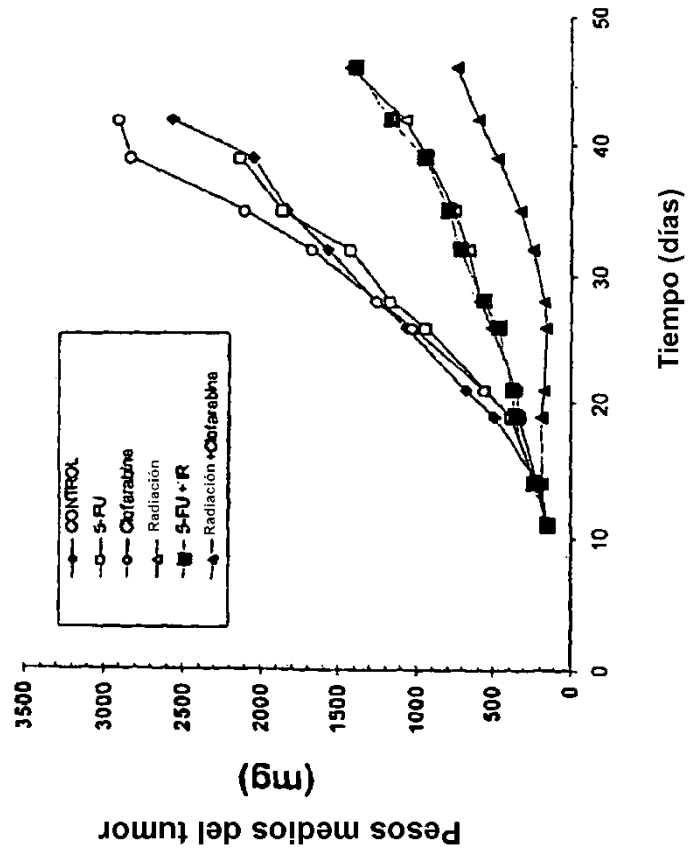


Figura 6

Efectos sinérgicos de la radiación y clofarabina

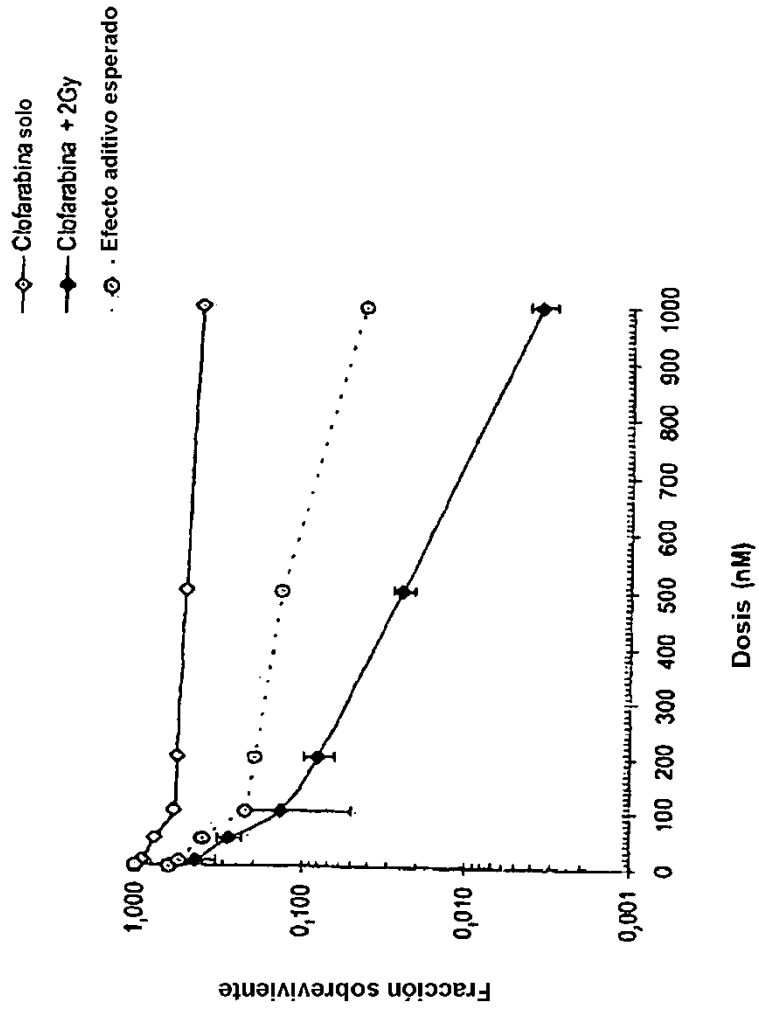


Figura 7

FORMACIÓN DE COLONIAS PARA CÉLULAS SKOV-3

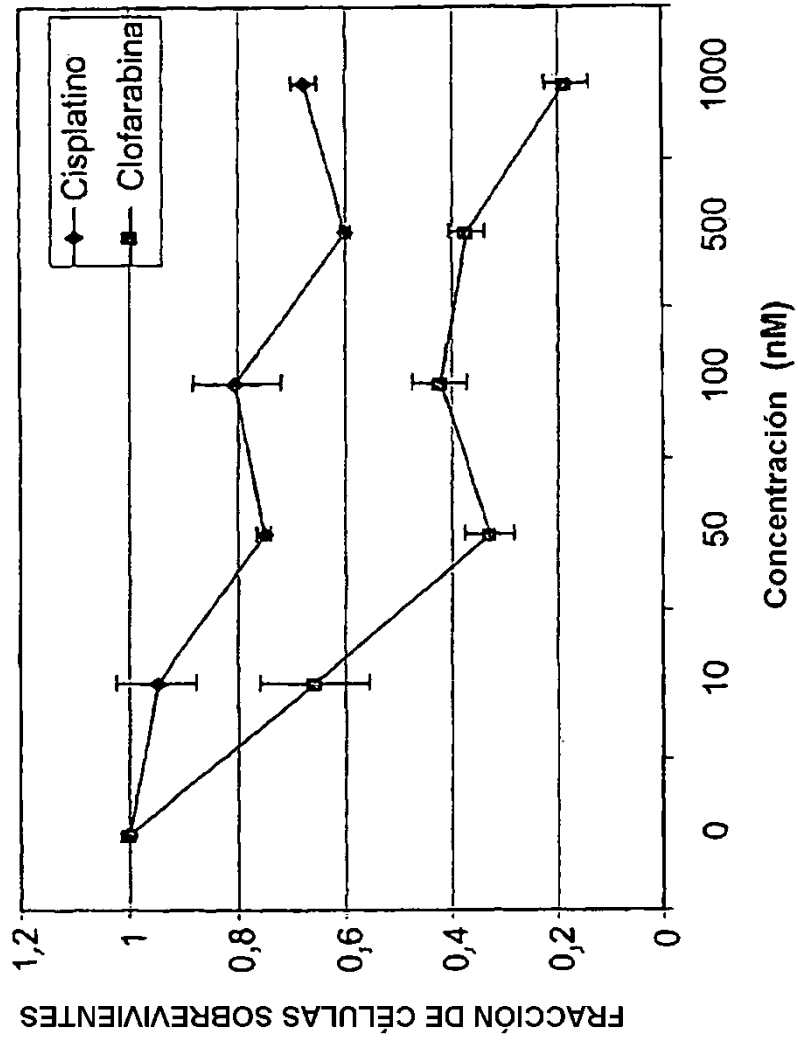


Figura 8

Actividad antitumoral de clofarabina en células SKOV-3

FORMACIÓN DE COLONIAS PARA CÉLULAS IGROV-1

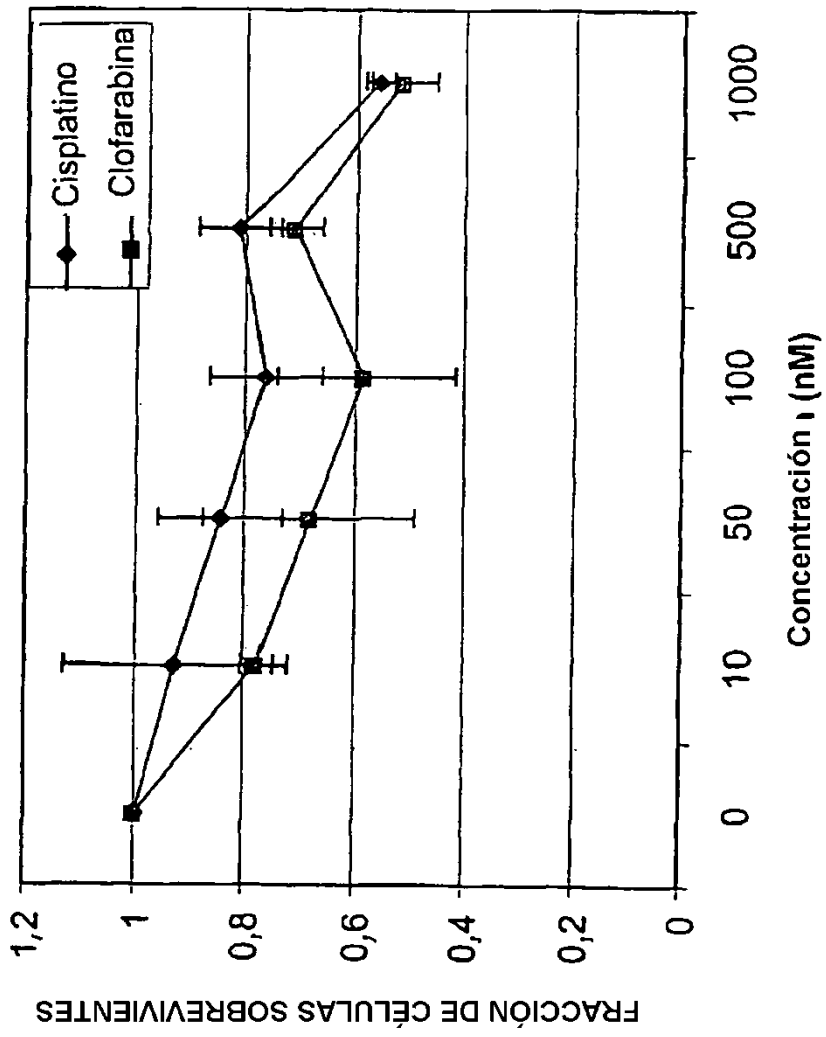


Figura 9

Actividad antitumoral de clofarabina en células IGROV-1