

COMPUESTOS PARA TRATAR EL CÁNCER CEREBRAL

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos tratamientos de
5 cánceres cerebrales que han sido particularmente resistentes al
tratamiento en el pasado, es decir, tumores cerebrales astrocíticos,
cánceres cerebrales que son cánceres metastatizados y linfomas
primarios del CNS.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer es una de las enfermedades más mortales. El cáncer
es una condición en la cual las células en una parte del cuerpo
experimentan un crecimiento fuera de control. De acuerdo con los
últimos datos de la Sociedad Americana del Cáncer, se estimó que
hubo 1.67 millones de nuevos casos de cáncer en los Estados
15 Unidos en 2014. El cáncer es la segunda causa de muerte en los
Estados Unidos (después de las enfermedades cardíacas) y se
estimó que ha cobrado más de 585,000 vidas en 2014. De hecho, se
estima que el 50% de todos los hombres y 33% de todas las mujeres
que viven en los Estados Unidos desarrollarán algún tipo de cáncer
20 en su vida. Por lo tanto, el cáncer constituye una importante carga
de salud pública y representa un costo significativo en los Estados
Unidos. Estas cifras se reflejan en otras partes de la mayoría de los
países a nivel mundial, aunque los tipos de cáncer y las
proporciones relativas de la población que desarrolla el cáncer
25 varían dependiendo de muchos factores diferentes como la genética

y la dieta.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, por sus siglas en inglés) clasifica los tumores cerebrales primarios en cuatro categorías. Los grados I y II de la OMS son gliomas de bajo grado, mientras que los astrocitomas anaplásicos y los oligodendrogliomas anaplásicos (grado III de la OMS), así como los glioblastomas (GBM, por sus siglas en inglés) (grado IV de la OMS) se denominan colectivamente gliomas malignos. El pronóstico de la mayoría de los tumores cerebrales primarios y secundarios es abismal debido a la falta de agentes terapéuticos eficaces. Son la principal causa de muerte por tumores sólidos en niños y la tercera causa de muerte por cáncer en adolescentes y adultos de 15-34 años (Jemal *et al.*, CA Cancer J Clin 59 2009 225-249).

Entre los gliomas malignos, los GBM son las neoplasias más comunes y fatales, que representan aproximadamente 50% de todos los gliomas. El GBM tiene un mal pronóstico, destacando la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento. La cirugía seguida por una terapia combinada del agente alquilizante temozolomida (TMZ, por sus siglas en inglés) y radioterapia es el tratamiento convencional para pacientes que sufren de GBM. El principal mecanismo de acción de TMZ es iniciado por metilaciones anormales de bases de ADN, particularmente O6-metilguanina en ADN (Verbeek *et al.*, Br Med Bui, 85, 2008, 17-33).

Sin embargo, muchos pacientes son resistentes o muestran solo una reacción débil al TMZ. Esto se ha mostrado que es

conferido por la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT, por sus siglas en inglés) mediada por la reparación de apareamiento erróneo (MMR, por sus siglas en inglés) (ver Weller *et al.*, Nat Rev Neurol, 6, 2010, 39-51). Los pacientes que tienen este sistema de
5 reparación tienen “GBM positivos a MGMT”. La activación de las trayectorias de mTOR/DNAPKC también se cree que desempeñan una parte. Hasta la fecha no se han desarrollado agentes quimioterapéuticos que sean activos contra GBM positivos a MGMT. La actividad de la MGMT también es importante en otros tumores
10 cerebrales astrocíticos, es decir, astrocitomas difusos (grado II de la OMS) y astrocitomas anapalásticos (grado III de la OMS). La progresión de estos a GBM es mediada principalmente a través de metilación mediante la MGMT. Por lo tanto, puede observarse que será deseable un agente terapéutico activo contra astrocitomas
15 positivos de la MGMT para prevenir el avance de estos astrocitomas difusos y anaplásicos a los GBM.

Por lo tanto, es esencial que un nuevo agente terapéutico con una excelente actividad antineoplásica no solo contra GBM negativos a MGMT sino también contra GBM positivos a MGMT (así como otros
20 tumores cerebrales astrocíticos), que muestra excelente penetración del CNS y tiene un perfil de toxicidad tolerable, sea urgentemente desarrollado.

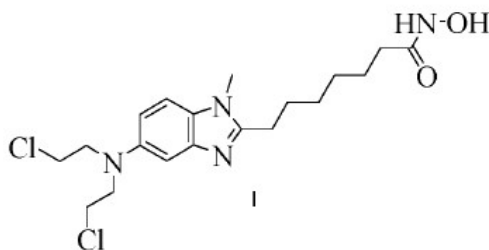
Un tumor cerebral metastásico comienza como un cáncer en otras partes del cuerpo y se propaga al cerebro. Los cánceres de
25 mama, pulmón, melanoma, colon y riñón comúnmente se

metastatizan. Frecuentemente, el tumor cerebral metastásico se descubre antes del tumor primario. Los tumores cerebrales metastásicos son los más comunes de todos los tumores cerebrales en adultos. Se estima que puede haber hasta 170,000 nuevos casos cada año. Aunque un poco mejor que para los GBM, el pronóstico para los cánceres cerebrales metastásicos es generalmente insuficiente. Una vez más, se adopta una combinación de cirugía, terapia y quimioterapia, con la combinación exacta de estas opciones dependiendo de la naturaleza del cáncer metastásico y la etapa de desarrollo (así como la salud del paciente). La cirugía (cuando es posible) y la radioterapia es el tratamiento convencional aplicado. A veces se emplea quimioterapia. Lamentablemente, ninguno hasta la fecha ha tenido mucho éxito. Parte de esto se debe a la necesidad de que el agente quimioterapéutico muestre excelente penetración del CNS (también, por supuesto, como excelente actividad antineoplásica y un perfil de toxicidad tolerable). Muchos agentes quimioterapéuticos existentes muestran una insuficiente penetración a través de la barrera hematoencefálica. Existe una necesidad urgente de un nuevo agente terapéutico que solucione estos problemas.

El linfoma primario del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés) se origina en los linfocitos, pero debe ser considerado un tumor cerebral debido a que su localización está únicamente en el cerebro y los desafíos terapéuticos se asemejan a los de otros tumores cerebrales. En particular, el suministro del

fármaco se ve afectado por la barrera hematoencefálica y la toxicidad cerebral limita el uso de los tratamientos actuales. La mayoría de los linfomas primarios del CNS son linfomas difusos de células B grandes (aproximadamente 90%). Aunque es relativamente raro, su incidencia y prevalencia están aumentando. Actualmente, el índice de supervivencia mediana con los regímenes de tratamiento existentes es de 44 meses. Todavía no se ha establecido un régimen de tratamiento particularmente eficaz para esta afección. El agente quimioterapéutico preferido actual es el metotrexato. Sin embargo, su penetración a través de la barrera hematoencefálica no es satisfactoria y tiene que ser administrada en dosis muy altas. La terapia combinada con radioterapia puede mejorar los resultados, pero los efectos secundarios pueden ser muy graves. Por lo tanto, existe la necesidad de un agente quimioterapéutico mejorado que tenga una mayor capacidad para penetrar en la barrera hematoencefálica y también muestre excelente actividad antineoplásica contra linfomas primarios del CNS.

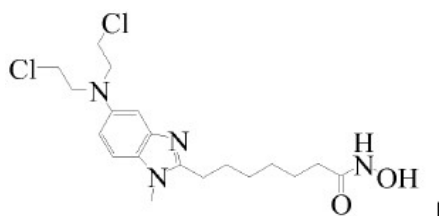
En el documento WO-A-2010/085377, se describe el compuesto de fórmula I siguiente. Es una molécula de fusión de HDACi alquilante de doble funcionalidad primera en clase que inhibe potentemente la trayectoria de HDAC.



Los ensayos biológicos mostraron que el compuesto de fórmula I inhibe potentemente las enzimas HDAC de clase 1 y clase 2 (por ejemplo, CI_{50} de HDAC1 de 9 nM) y se ha mostrado que tiene una excelente actividad *in vitro* contra líneas celulares de mieloma múltiple. Por otra parte, suprime la reparación del ADN a través de regulación por disminución significativa de FANCD2, BRCA1, BRCA2 y TS (timidilato sintetasa), posiblemente relacionados con la inhibición de HDAC6 y HDAC8. El ensayo de citotoxicidad en líneas celulares NCI-60 ha mostrado que tiene una actividad anticancerígena muy potente con un valor de CI_{50} mediano de 2.2 μ M comparado con 72 μ M para mendamustina. El documento WO-A-2013/113838 incluye los datos que demuestran la actividad del compuesto de fórmula I (referida como NL-101 en la descripción) contra un número de líneas celulares, que incluyen algunas líneas celulares de glioblastoma. Sin embargo, cada una de las líneas celulares en cuestión es una línea celular de tumor de GBM negativos a MGMT.

Breve descripción de la invención

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo:



Para uso en el tratamiento de un cáncer cerebral seleccionado de un tumor astrocítico cerebral positivo a MGMT, un cáncer cerebral metastásico y un linfoma del CNS primario.

En estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* se ha mostrado que el compuesto de fórmula I es activo contra no solo tumores de GBM
5 negativos a MGMT sino también tumores de GBM positivos a MGMT. A partir de esto, también puede esperarse que fuera activo contra otros tumores astrocíticos positivos a MGMT. También se ha encontrado que el compuesto de fórmula I es capaz de penetrar muy
10 bien la barrera hematoencefálica, lo que la hace ideal para uso terapéutico contra no solo tumores astrocíticos positivos a MGMT, sino también otros tumores cerebrales. En particular, se ha encontrado además que tiene muy buena actividad contra cáncer cerebral metastásico y también linfoma del CNS primario.

En un segundo aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer cerebral seleccionado de un tumor astrocítico cerebral positivo a MGMT, un cáncer cerebral
15 metastásico y linfoma del CNS primario.
20

En un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar un cáncer cerebral seleccionado de un tumor astrocítico cerebral positivo a MGMT, un cáncer cerebral metastásico y un linfoma del CNS primario en un paciente en necesidad del
25 mismo, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto

de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica de la concentración de EDO-S101 (μM) comparada con el tiempo en el fluido cefalorraquídeo y la sangre contra tiempo;

La figura 2 es una gráfica de la CI_{50} para las doce líneas celulares GBM probadas después de que se administró la temozolomida;

La figura 3 es una gráfica de la CI_{50} para las doce líneas celulares de GBM probadas después de que se administró la temozolomida y vorinostat;

La figura 4 es una gráfica de la CI_{50} para las doce líneas celulares de GBM probadas después de que se administró la bendamustina;

La figura 5 es una gráfica de la CI_{50} para las doce líneas celulares GBM probadas después de que se administró la bendamustina y vorinostat;

La figura 6 es una gráfica del porcentaje de supervivencia celular comparado con la concentración de EDO-S101 (μM) para cada una de las doce líneas celulares probadas;

La figura 7a es una gráfica de luminiscencia comparada con el tiempo como una medida del crecimiento después de la inyección de células GBM12;

La figura 7b es una gráfica del porcentaje de supervivencia comparado con el tiempo que muestra la prolongación de

supervivencia para EDO-S101 contra bendamustina y control;

La figura 8 es una gráfica de la probabilidad (%) del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés) comparada con el tiempo para ratones portadores de tumores U251
5 implantados tratados con EDO-S101;

La figura 9 es una gráfica de la probabilidad (%) del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés) comparada con el tiempo para ratones portadores de tumores U87 implantados tratados con EDO-S101;

10 La figura 10 es una gráfica de fracción de supervivencia comparada con la dosis de radioterapia (Gy) para células U251, U87 y T98G tratadas con radioterapia sola, radioterapia y 2.5 μ M de EDO-S101 (mostrada como NL-101 en la figura) y 5 μ M de EDO-S101;

15 La figura 11 es una gráfica de la probabilidad (%) del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés) comparada con el tiempo para ratones portadores de tumores U251 implantados tratados con control, radioterapia y EDO-S101;

La figura 12 es una gráfica de la probabilidad (%) del tiempo
20 transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés) comparada con el tiempo para ratones que tiene tumores U251 implantados tratados con control, radioterapia y temozolomida, EDO-S101 y radioterapia y EDO-S101;

La figura 13 es una gráfica de la probabilidad (%) del tiempo
25 transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés)

comparada con el tiempo para ratones portadores de tumores U87 implantados tratados con control, radioterapia y EDO-S101;

La figura 14 es una gráfica de la probabilidad (%) del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés) comparada con el tiempo para ratones portadores de tumores U87 implantados tratados con control, radioterapia y temozolomida, EDO-S101 y radioterapia y EDO-S101;

Las Figuras 15 y 16 son imágenes de bioluminiscencia de ratones U251 GBM ortopólicos transfectados con luciferasa, después del tratamiento con vehículo de control, EDO-S101, temozolomida y radioterapia y temozolomida;

La figura 17 es una gráfica de probabilidad de supervivencia (%) comparada con el tiempo para ratones U251 GBM ortopólicos transfectados con luciferasa, después del tratamiento con vehículo de control, radioterapia, EDO-S101, temozolomida y radioterapia y temozolomida;

La figura 18 es una gráfica del porcentaje de supervivencia comparado con el tiempo para ratones que tiene linfomas OCI-LY10 CNS implantados tratados con control, bendamustina y EDO-S101; y

La figura 19 es una gráfica del porcentaje de supervivencia comparado con el tiempo para ratones portadores de cáncer de mama metastásico triple negativo del cerebro después de la transfección con células de cáncer de mama MB-468 tratadas con control, bendamustina y EDO-S101.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, se usa un número de términos y frases generales, que deben interpretarse como sigue.

Un tumor astrocítico cerebral es un tumor derivado de células gliales en forma de estrella (astrocitos) en el cerebro. Se dividen en grado bajo (I y II) y grado alto (III y IV). Los tumores astrocíticos de grado II se conocen como astrocitomas difusos. Aunque estos crecen con relativa lentitud, pueden desarrollarse en tumores primarios malignos. Los tumores astrocíticos de grado III se conocen como astrocitomas anaplásticos. Estos son tumores malignos; crecen más rápidamente y tienden a invadir tejido sano cercano. Los tumores astrocíticos de grado IV se conocen como glioblastoma multiforme (GBM, por sus siglas en inglés).

Estos son muy malignos, crecen rápidamente, se extienden fácilmente a los tejidos cercanos y son muy difíciles de tratar con tratamientos convencionales.

El tratamiento quimioterapéutico convencional actual es con temozolomida (TMZ, por sus siglas en inglés). Sin embargo, muchos pacientes son resistentes o muestran una reacción débil a la reacción. Esto se ha mostrado que será conferido por la O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT, por sus siglas en inglés) mediada por la reparación de apareamiento erróneo (MMR, por sus siglas en inglés) (ver Weller *et al.*, Nat Rev Neurol, 6, 2010, 39-51). Los pacientes que tienen este sistema de reparación tienen los “GBM positivos a MGMT”. Los GBM se dividen, así como los GBM negativos a MGMT y los GBM positivos a MGMT dependiendo de si

expresan el gen de la MGMT. Se ha mostrado que los compuestos de fórmula I de la presente invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo serán activos contra no solo los GBM negativos a MGMT sino también los GBM positivos a MGMT.

5 La actividad de la MGMT también es importante en otros tumores cerebrales astrocíticos, es decir, astrocitomas difusos (grado II de la OMS) y astrocitomas anapalásticos (grado III de la OMS). La progresión de estos a GBM es mediada principalmente por metilación por la MGMT. Por lo tanto, puede observarse que a
10 medida que el compuesto de fórmula I y sales farmacológicamente del mismo son activas contra astrocitomas positivos a MGMT, también serán capaces de prevenir el avance de estos astrocitomas difusos y anaplásticos a GBM.

 Un tumor cerebral metastásico es un tumor cerebral que
15 comienza como un cáncer en otras partes del cuerpo y se propaga al cerebro. Comúnmente se metastatizan los cánceres de mama, pulmón, melanoma, linfoma sistémico, sarcoma, colon, gastrointestinal y riñón.

 Un linfoma del CNS primario en el contexto de la presente
20 invención es un linfoma que se origina en los linfocitos en el cerebro, células malignas formadas a partir de dichos linfocitos. Por lo tanto, se considera un tumor cerebral debido a que su ubicación y desafíos terapéuticos se asemejan a los de otros tumores cerebrales.

 "Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de
25 compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente

aceptables, como se define anteriormente, y que poseen la actividad farmacológica deseada. Tales sales incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, o con ácidos orgánicos. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de base que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácidos minerales como, por ejemplo, sales de adición de ácido clorhídrico, bromhidrato, hidroyoduro, sulfato, bisulfato, sulfamato, nitrato, fosfato y de ácido orgánico como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, salicilato, tosilato, lactato, naftalensulfonato, malato, mandelato, metansulfonato y p-toluensulfonato. Ejemplos de sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas como, por ejemplo, sales de etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilentanolamina, trietanolamina y aminoácidos básicos.

En la presente invención, la sal farmacológicamente aceptable del compuesto de fórmula I puede ser preferiblemente el

hidrocloruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, bisulfato, sulfamato, nitrato, fosfato, citrato, metansulfonato, trifluoroacetato, glutamato, glucuronato, glutarato, malato, maleato, succinato, fumarato, tartrato, tosilato, salicilato, lactato, naftalensulfonato o acetato, y
5 más preferiblemente el acetato.

En la presente invención, cuando el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo es para uso en el tratamiento de un tumor astrocítico cerebral positivo a MGMT, éste se selecciona preferiblemente de un glioblastoma multiforme
10 positivos a MGMT, un astrocitoma difuso (grado II de la WHO) y un astrocitoma anaplásico (grado III de la WHO), y más preferiblemente un glioblastoma multiforme positivos a MGMT.

En la presente invención, cuando el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo es para uso en el
15 tratamiento de un cáncer cerebral metastásico, éste se selecciona preferiblemente de cáncer de mama metastatizado, linfoma sistémico metastatizado, cáncer de pulmón metastatizado, melanoma metastatizado, metástasis metastatizado y cáncer gastrointestinal metastatizado, y más preferiblemente cáncer de mama
20 metastatizado.

La cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable y el medicamento que comprende administrarlo al paciente de acuerdo con el primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención es una cantidad
25 que confiere un efecto terapéutico de acuerdo con la presente

Invención sobre el sujeto tratado, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o
5 siente un efecto). Se cree que una cantidad eficaz del compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención se cree que será una donde el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se incluye en un intervalo de dosificación de 0.1 a 70 mg/kg
10 de peso corporal del paciente (por ejemplo, 0.5 a 50 mg/kg de peso corporal, como 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 mg/kg de peso corporal).

El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se será tratado y la gravedad del
15 trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, ruta de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados
20 en combinación o simultáneamente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Ejemplos adecuados de la forma de administración del compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del
25 mismo y el medicamento que comprende la misma de acuerdo con el

primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y el medicamento que comprende el mismo se administraron parenteralmente y más preferiblemente intravenosamente.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administró intravenosamente al paciente en necesidad del mismo a un nivel de dosificación al paciente en necesidad del mismo de 0.1 mg/kg a 70 mg/kg de peso corporal del paciente y lo más preferiblemente Intravenosamente al paciente en necesidad del mismo a un nivel de dosificación de 0.5 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal del paciente.

Se ha encontrado que, en el primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención, el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo puede administrarse preferiblemente a un paciente en necesidad del mismo en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de tratamiento, en los días 1 y 8 de un ciclo de tratamiento o el día 1 solo de un ciclo de tratamiento.

En otra modalidad preferida del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que el compuesto de fórmula I y sus sales

farmacológicamente aceptables son considerablemente más eficaces cuando se administraron en combinación con radioterapia, y de hecho parecen ser sinérgicos con la radioterapia, tanto en estudios *in vitro* e *in vivo*. Como consecuencia, en el primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención, el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o el medicamento que comprende el mismo puede usarse en el tratamiento de un paciente en necesidad del mismo, en donde el paciente en necesidad del mismo también recibe radioterapia antes o después del tratamiento del cáncer cerebral con el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o el medicamento que comprende el mismo. Preferiblemente, el paciente recibe tratamiento de radioterapia antes del tratamiento con el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o el medicamento comprende el mismo. La radioterapia puede administrarse a una dosis de 1 a 5 Gy durante 5 días consecutivos y preferiblemente 2 Gy durante 5 días consecutivos.

En una modalidad preferida adicional del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención, el tratamiento comprende además la administración a un paciente en necesidad del mismo de un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), y el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo y el inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) pueden administrarse concurrente, secuencial o separadamente, y

preferiblemente de manera concurrente. Preferiblemente, el inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) es bevacizumab.

En una modalidad preferida adicional de la primera, segunda y
5 tercera modalidades de la presente invención, el tratamiento comprende además la administración a un paciente en necesidad del mismo de un inhibidor de poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés), y el compuesto de fórmula I o un una sal farmacológicamente aceptable del mismo y el inhibidor de poli-ADP-
10 ribosa-polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés) pueden administrarse simultánea, secuencialmente o separadamente, y preferiblemente de manera concurrente. Preferiblemente, el inhibidor de poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés) se selecciona de rucaparib, olaparib y veliparib.

En una modalidad preferida adicional de la primera, segunda y
15 tercera modalidades de la presente invención, el tratamiento comprende además la administración a un paciente en necesidad del mismo de un inhibidor de PD-1/PDL-1 (punto de comprobación inmunitario) y el compuesto de fórmula I o un una sal farmacológicamente aceptable del mismo y el inhibidor de PD-1/PDL-
20 1 (punto de comprobación inmunitario) pueden administrarse concurrente, secuencial o separadamente, y preferiblemente de manera concurrente. Preferiblemente, el inhibidor de PD-1/PDL-1 (punto de comprobación inmunitario) es ipilimumab.

25 Cuando está destinado a la administración oral, el compuesto

de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención puede estar en forma sólida o líquida, en donde las formas de suspensión y gel semisólido, semilíquido están incluidas dentro de las formas consideradas en la presente como sólidas o líquidas.

El compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o un medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención pueden prepararse para la administración usando una metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Ejemplos de formulaciones farmacéuticas y portadores adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

Como una composición sólida para administración oral, el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención puede formularse en un polvo, gránulo, tableta comprimida, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o la forma similar. Tal composición sólida contiene comúnmente uno o más diluyentes inertes, ya sea como una única tableta que comprende todos los agentes activos o como un número de composiciones sólidas separadas, cada una que comprende un solo agente activo de la combinación de la presente invención (en el caso del kit). Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes como carboximetilcelulosa, etilcelulosa,

celulosa microcristalina o gelatina; excipientes como almidón, lactosa o dextrinas, agentes desintegrantes como ácido algínico, alginato de sodio, almidón de maíz y similares; lubricantes como estearato de magnesio; deslizantes como dióxido de silicio coloidal; 5 agentes endulzantes como sacarosa o sacarina; un agente saborizante como saborizante de menta, salicilato de metilo o naranja; y un agente colorante.

Cuando el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que 10 comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención está en forma de cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

15 El compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para administración oral o para suministro por inyección. Cuando se propone para la 20 administración oral, un compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención puede comprender uno o más de un agente 25 endulzante, conservantes, tinte/colorante y potenciador de sabor. En

un compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención para administración por inyección, también pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, amortiguador, agente estabilizador e isotónico.

La ruta de administración preferida es la administración parenteral, que incluyen, pero no se limita a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, intranasal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intravaginal o transdérmica. El modo de administración preferido queda a discreción del médico, y dependerá en parte del sitio de la afección médica (como el sitio del cáncer). En una modalidad más preferida, el compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención se administraron intravenosamente.

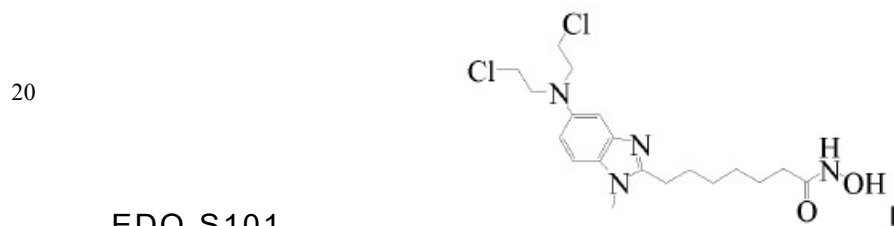
El compuesto líquido de fórmula I o una sal farmacológicamente aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también puede incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico

isotónico, aceites fijos como mono o diglicéridos sintéticos, polietilenglicoles, glicerina u otros solventes; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabeno; y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. Una
 5 combinación o composición parenteral puede encerrarse en una ampolla, una jeringuilla desechable o un vial de múltiples dosis hecho de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido.

El compuesto de fórmula I o una sal farmacológicamente
 10 aceptable del mismo o medicamento que comprende el mismo del primer, segundo y tercer aspectos de la presente invención puede administrarse por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos, y preferiblemente
 15 mediante inyección en bolo.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, el compuesto que tiene la siguiente fórmula I se refiere como



Se preparó EDO-S101 como se describe en el ejemplo 6 del documento WO-A-2010/085377. Se disolvió EDO-S101 en DMSO
 25 (solución madre 100X) y se almacenó a 4°C antes de ser suspendido

en medio el día de uso.

Ejemplo 1 Análisis farmacocinético de CNS de EDO-S101 en ratas Sprague-Dawley

Los farmacocinéticos del CNS se determinaron en ratas
5 después de una inyección en la vena de la cola de EDO-S101 a 40
mg/kg. Se recolectaron muestras de microdializadas de la sangre y
un ventrículo del cerebro a través de sondas de microdiálisis a 18
intervalos de tiempo. Las concentraciones de fármaco en estas
muestras se determinaron mediante electroforesis capilar con
10 detección UV (CE-UV, por sus siglas en inglés) seguida de cálculos
para diversos parámetros farmacocinéticos.

Se anestesiaron seis ratas con isoflurano gasiforme (1% de
isoflurano en una mezcla de 20% de oxígeno y 80% de gas nitrógeno)
y se inmovilizaron en un marco estereotáxico (KOPF Instruments,
15 Tujunga, CA). La anestesia se mantuvo durante todo el procedimiento.
Cada cánula guía (CMA Microdialysis Inc., Acton, MA) se implantó de
manera estereotáctica en el ventrículo lateral (AP -0.9, L 1.6, V 3.4,
con relación al bregma y cráneo), luego se fijó al cráneo mediante
tornillos y cemento dental. Después de la cirugía, cada rata se alojó
20 individualmente con alimento y agua a voluntad durante 3 días para la
recuperación de la cirugía de canulación. Se realizaron experimentos
de microdiálisis en ratas conscientes que se mueven libremente. En el
día del experimento, se reemplazó el estilete en la cánula guía por la
sonda de microdiálisis (CMA/11 con membrana de 4 mm, CMA
25 Microdialyse Inc., Acton, MA) y una sonda de microdiálisis vascular

(CMA/20 con membrana de 4 mm, CMA Microdialysis Inc, Acton, MA)) se implantó en la vena yugular. Las sondas tenían tubos de entrada conectados a jeringas para suministrar fluido cefalorraquídeo artificial (146 mM de NaCl, 1.2 mM de CaCl_2 , 3 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 , 1.9 mM de Na_2HPO_4 , 0.1 mM de NaH_2PO_4 , pH 7.4) en el ventrículo y solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (D-PBS, por sus siglas en inglés) en la sangre a una velocidad de flujo de 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Los tubos de salida se conectaron a un colector de microfracción para recolectar los microdializados a 4°C. Se dejó que las ratas se recuperaran durante al menos 24 horas antes de la dosificación. Se recolectaron 18 muestras durante 3 horas después de la inyección de EDO-S101 (intravenosamente). Todas las muestras se aplicaron a la electroforesis capilar con detección UV (CE-UV, por sus siglas en inglés) para la determinación de la concentración de EDO-S101 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre. Se sacrificaron las ratas usando inhalación de CO_2 después del experimento. La posición de la sonda se verificó mediante inspección visual al final de cada experimento.

EDO-S101 en el microdializado se midió mediante CE-UV (Agilent 3D CE). En resumen, los capilares se preacondicionaron con hidróxido sódico 1 M durante 2 min, agua durante 2 min y amortiguador de corrida [100 mmol/l de solución de acetato de amonio (ajustar a pH 3.1 con ácido acético)-acetonitrilo (50:50, v/v)] durante 3 min. Se inyectaron las muestras a una presión de 0.7 psi durante 5 s y el volumen de inyección fue de aproximadamente 5 nl. Después de la inyección, se separó EDO-S101 en un capilar de sílice

fundido de 50 μm I.D. y longitud de 50/65 cm (longitud efectiva/longitud total) bajo 15 kv y 25°C. La absorbancia de EDO-S101 se detectó con UV a 300 nm. La emisión se recolectó en un tubo fotomultiplicador (PMT, por sus siglas en inglés).

5 Para realizar un análisis estadístico de los datos, se usó un ANOVA bidireccional de mediciones repetidas seguido por el ensayo de Tukey. $P < 0.05$ se consideró significativo. La penetración del CNS se determina como la relación del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de CSF y sangre.

10 Al analizar los resultados, se encontró que EDO-S101 atraviesa la barrera hematoencefálica bien con una penetración del CNS de 16.5% (ver la figura 1). Puede alcanzar una alta concentración de CNS con una C_{max} de 11.2 μM . Como tal, EDO-S101 es ideal para el uso terapéutico en tumores cerebrales. También se mostró que tiene
15 una vida promedio muy corta de aproximadamente 6 minutos en la sangre y unos 9 minutos en el cerebro. Como las concentraciones de fármaco se determinaron con base en la absorbancia de EDO-S101 a la longitud de onda UV de 300 nm, todas las mediciones se realizaron sobre el EDO-S101 no metabolizado. Los resultados se
20 resumen en la Tabla 1 como sigue.

Tabla 1

Parámetros de PK	Sangre	Cerebro
C_{max} (MM)	184.0 $\pm$ 61.8	11.2 $\pm$ 6.5
T_{max} (min)	2.33 $\pm$ 0.82	5.67 $\pm$ 1.97
$T_{1/2}$ (min)	5.6 $\pm$ 1.07	8.8 $\pm$ 1.43
AUC (0-12) ($\mu\text{M}\cdot\text{hr}$)	824.3 $\pm$ 110.8	136.2 $\pm$ 74.7
Relación de AUC (cerebro:sangre)	16.5% $\pm$ 0.09	

Ejemplo 2 Pruebas de actividad *in vitro* para EDO-S101 y compuestos conocidos contra diversas líneas celulares positivos a MGMT y negativa

Se idearon experimentos *in vitro* en los que se usaron una
5 serie de líneas celulares GBM representativas para células tumorales
negativas a MGMT y positivas a MGMT.

Compuestos: 1-100 μM de EDO-S101, 1-50 μM de
temozolomida (TMZ), 1-50 μM de temozolomida + 500 nM de
vorinostat, 1-40 μM de bendamustina, 1-40 μM de bendamustina y
10 500 nM de vorinostat.

Líneas celulares: A172, LN229, SNB19, SW1783, U251, U373 y
U87: líneas celulares negativas a MGMT; LN18, Mz54, T98G, U138,
U118: líneas celulares positivas a MGMT.

Se usaron doce líneas celulares de glioblastoma que
15 representan gliomas de grado III y IV y con diferentes expresiones
de MGMT, sensibilidad a fármacos y radioterapia y cinco células
madre de glioblastoma derivadas de pacientes (ver antes). Cuatro
células madre de glioblastoma derivadas de pacientes, amablemente
proporcionadas por J. Gregory Cairncross, y Samuel Weiss en el
20 Hotchkiss Brain Institute, Faculty of Medicine, University of Calgary,
Calgary, Alberta, Canadá y una luciferasa transfectada, PTC#8, del
Prof Angelo Vescovi, Universidad la Bicocca, Milán, se cultivaron en
medio de cultivo definido libre de suero (SFM, por sus siglas en
inglés) y en cultivo de esferas no adherentes. Las células se
25 resuspendieron en medio DMEM/F12 sin suero suplementado con 20

ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (Sigma-Aldrich), B-27 suplemento 1X (Gibco, Life Tecnologías) y antibióticos. Se agregó el tratamiento con EDO-S101 directamente después de sembrar 3×10^3 células en placas de 96 pozos con el medio de células madre. Las esferas se contaron 5 días después del tratamiento bajo un microscopio invertido con una ampliación de $\times 4$. Se contó una esfera si tenía al menos 15 células.

Las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/ml en placas de 24 pozos. Las células se dejaron unir y crecer en 5% de DMEM de FCS durante 24 h. Después de este tiempo, las células se mantuvieron en las condiciones de cultivo apropiadas. Los controles morfológicos se realizaron diariamente con un fotomicroscopio de contraste de fase invertida (Nikon Diaphot, Tokio, Japón), antes de la tripsinización celular y recuento. Las células tripsinizadas y resuspendidas en 1.0 ml de solución salina se contaron usando el NucleoCounterTM NC-100 (sistemas de contadores de células automatizadas, Chemotec, Cydevang, DK) con el fin de evaluar la viabilidad celular. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de CI_{50} se calcularon mediante el método GraFit (Erithacus Software Limited, Staines, Reino Unido). La viabilidad celular se midió con el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich).

Los valores de CI_{50} y CI_{20} para las doce líneas celulares contra bendamustina y vorinostat también se determinaron como se ha

descrito anteriormente. A continuación, se realizaron ensayos de combinación con dosis fija de vorinostat (valor de CI_{20}) y variando la dosis de bendamustina. Se calcularon nuevos valores de CI_{50} para la bendamustina cuando se combinaron con vorinostat.

5 Como puede verse en la figura 2, las líneas celulares de GBM U251, U373, SW1783, A172 y U87 son altamente sensibles a TMZ, mientras que LN229, SNB19 y U138 son moderadamente sensibles. Sin embargo, las líneas celulares de GBM positivos a MGMT LN18, Mz54, T98G y U118 fueron resistentes a TMZ.

10 En un experimento separado, TMZ se usó en combinación con 500 nM de vorinostat. Se sabe que vorinostat es sinérgico con TMZ en líneas celulares de GBM. Como puede verse en la figura 3, mientras que las líneas celulares de GBM positivos a MGMT LN18 y U118 eran sensibles a esta combinación, T98G y Mz54 eran todavía
15 muy resistentes. La CI_{50} de T98G se redujo, pero no es el intervalo de dosis alcanzables en humanos.

 La figura 4 muestra que ninguna de las líneas celulares de GBM era altamente sensible a la bendamustina, mientras que las líneas celulares de GBM LN18, LN229, SNB19, U138, U251, U373,
20 SW1783 y U87 eran moderadamente sensibles a la bendamustina, mientras que A172, Mz54, T98G y U118 eran resistentes a la bendamustina. Como puede verse en la figura 5, cuando la bendamustina se combinó con 500 nM de vorinostat, se alcanzaron resultados muy similares a los de TMZ y vorinostat, es decir, todas
25 las líneas celulares eran altamente sensibles excepto Mz54 y T98G y

mientras que la CI_{50} de T98G se redujo no es el intervalo de dosis alcanzables en humanos.

En comparación con los otros compuestos y combinaciones individuales, las curvas de CI_{50} para las doce líneas celulares probadas en la figura 6 demuestran que las doce líneas celulares que incluyen todas las líneas celulares positivas a MGMT eran altamente sensibles a EDO-S101. Esto demuestra que EDO-S101 es un agente terapéutico altamente prometedor contra los GBM negativos a MGMT y positivos a MGMT.

Un resumen de los valores de CI_{50} para las diferentes líneas celulares se muestra en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

Línea celular Origen Características Bendamustina EDO-S101 Temozolomida

U251MG	Sigma-Aldrich (09063001)	negativo a MGMT	30.0	6.60	20.0
U87MG	ATCC (HTB-14)	negativo a MGMT	50.0	1.36	20.0
T98G	ATCC CRL-1690	positivo a MGMT	52.0	7.70	> 100
U118MG	HTB-15	positivo a MGMT	35.0	6.61	> 100
U373MG (Uppsala)	Sigma-Aldrich (08061901)	negativo a MGMT	35.0	2.26	80.0

	Línea celular	Origen	Características	Bendamustina	EDO-S101	Temozolomida
5	Mz-54	Goethe-University Frankfurt	positivo a MGMT	60.0	12.73	> 100
	A172	CRL-1620	negativo a MGMT	55.0	6.45	~100
	U138MG	ATCC (HTB-16)	positivo a MGMT	30.0	4.27	> 100
10	LN228	ATCC (CRL-2611)	negativo a MGMT	35.0	1.55	> 100
	SW1783	ATCC (HTB-13)	negativo a MGMT	38.0	8.24	80.0
	LN18	ATCC (CRL-2610)	positivo a MGMT	25.0	1.87	> 100
15	SNB19	NCI	negativo a MGMT	32.0	2.17	> 100

Ejemplo 3 Evaluación *in vivo* de EDO-S101 en modelos murinos para glioblastoma multiforme

La actividad terapéutica de EDO-S101 se determinó en modelos de tumores cerebrales murinos contra GBM, con base en el crecimiento tumoral como se determinó mediante imagenología de bioluminiscencia y análisis de supervivencia como se determinó mediante análisis de Kaplan-Meier.

Se crearon modelos de tumores cerebrales murinos mediante

inyección intracerebral de 3×10^5 células GBM12 transfectadas con luciferasa en ratones atímicos bajo anestesia usando una plataforma estereotáctica. GBM12 es una línea celular de tumor negativa a MGMT. Los ratones atímicos de ocho semanas de edad se
5 sometieron a una aclimatación/cuarentena mínima de 7 días antes de la cirugía. La cirugía se realizó en una campana de flujo laminar bajo condiciones estériles. Se administró Tylenol 300 mg/kg PO para analgesia 24 horas antes de la cirugía, continuando 48 horas postoperatorias. La anestesia se logró mediante inhalación de 1-2%
10 de isoflurano. Después el ratón se anestesió bien, se colocó en el instrumento estereotáctico Kopf. Una pequeña cantidad de crema antibiótica de BNP (una mezcla de bacitracina, neomicina y polimixina) se untó en sus ojos para prevenir la infección y daño corneal durante la cirugía. Una tira de tela suave se colocó sobre el
15 cuerpo del ratón y la cola para evitar la pérdida de calor excesivo durante la cirugía. El área del cuero cabelludo se limpió con un 2% de solución de betadina y se secó con un aplicador con punta de algodón. Se realizó una incisión sagital en la línea media en el cuero cabelludo.

20 Se perforó un pequeño orificio en el cráneo izquierdo con un taladro quirúrgico (Kopf) o un taladro Dremel de acuerdo con las coordenadas (AP: 0.5 mm, LM: 2.5 mm) como se determinó con referencia al atlas cerebral del ratón de Franklin y Paxinos. La duramadre fue expuesta quirúrgicamente y una jeringuilla de 10 µl
25 Hamilton con una aguja biselada de calibre 26S se bajó en el

hemisferio cerebral izquierdo hasta la profundidad de 3 mm y 5 μ l de las células tumorales de 3×10^5 células GBM12 transfectadas con luciferasa se infundieron lentamente (0.5 μ l/min). La aguja se dejó en su lugar durante 5 minutos para prevenir el reflujo y luego se retiró lentamente. Se cerró la piel con pinzas para heridas. Después de la cirugía, los ratones se recuperaron en un ambiente cálido y regresaron a sus jaulas cuando regresó la actividad motora. Las jaulas se colocaron en la parte superior de una almohadilla de calentamiento para minimizar la pérdida de calor corporal durante la recuperación. Los ratones se supervisaron después de la operación al menos dos veces al día durante 5 días o hasta que la recuperación se completó. Se administraron EDO-S101 (60 mg/kg de peso corporal) o bendamustina (50 mg/kg de peso corporal) a través de la vena de la cola comenzando al día +4 después de la implantación de células tumorales intracerebrales y entonces posteriormente al día +11 y día +18. La parálisis de los miembros se tomó como un punto final para el análisis de supervivencia.

Después de la inyección intracerebral de las células GBM, todos los ratones se sometieron a generación de imágenes por bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) dos veces por semana a partir del día 4 después de la inyección intracerebral para supervisar el crecimiento de tumores *in vivo* en tiempo real. La BLI se realizó usando un sistema de imagenología óptica Xenogen Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Se anestesiaron los ratones con isoflurano antes de las inyecciones intraperitoneales de

luciferina a una dosis de 150 mg/kg, proporcionando una concentración de sustrato saturante para la enzima luciferasa. Las señales luminiscentes máximas se registraron 10 minutos después de la inyección de luciferina. Las regiones de interés que abarcan el
5 área intracraneal de la señal se definieron usando el software Living Image (Xenogen, Alameda, CA), y se registró el total de fotones/s/esteradio/cm².

Se usó ANOVA para determinar la significación estadística de las diferencias entre los grupos experimentales en cada momento.
10 Se generaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier usando el software Prism4 (GraphPad Software, LaJolla CA) y la diferencia estadística entre las curvas se obtuvo con una prueba log-rank. P<0.05 se consideró significativo.

En este modelo de xenoinjerto derivado del paciente para GBM
15 (GBM12), se administró EDO-S101 a 60 mg/kg IV a los días +4, +1, +18 después de la implantación intracerebral de células tumorales (dosis de MTD). Se administró bendamustina a dosis de 50 mg/kg IV semanalmente a los días +4, +11, +18 (dosis de MTD). Se encontró que EDO-S101 tenía actividad terapéutica significativa con supresión
20 del crecimiento tumoral y prolongación de la supervivencia con una supervivencia media de 66 días en comparación con 58 días con bendamustina y 52 días en controles sin tratamiento (ver las figuras 7a y 7b). EDO-S101 tiene una actividad terapéutica excelente contra este glioblastoma multiforme negativo a MGMT.

25 El procedimiento anterior se siguió de manera similar usando

las líneas celulares U87G y U251 G. Una vez más, se administró EDO-S101 (60 mg/kg) intravenosamente a través de la vena de la cola, pero en estos experimentos se administró a los días 1, 8 y 15. En lugar de bendamustine, se administró TMZ como una
 5 comparación a 16 mg/kg durante 5 días consecutivos, po. Se sacrificaron los ratones después de 28 días.

La gráfica de la probabilidad (%) del tiempo transcurrido hasta la progresión (TTP, por sus siglas en inglés) contra tiempo en la figura 8 para ratones que tiene tumores U251 implantados muestra
 10 que la TTP para los ratones tratados con EDO-S101 fue significativamente más larga que la observada tanto para los ratones control como para los tratados con TMZ. Se observó un aumento significativo similar en TTP para ratones que tenían tumores U87 implantados, con EDO-S101 que tenía una TTP significativamente
 15 más larga que la de control y TMZ (ver la figura 9).

Ejemplo 4 Evaluación *in vivo* de EDO-S101 (solo o en combinación con radioterapia) en modelos murinos para glioblastoma multiforme contra radioterapia y temozolamida (sola o en combinación)

20 En un primer experimento, las líneas celulares U251, U87 y T98G se trataron con radioterapia solo o con radioterapia y EDO-S101.

Para la supervivencia clonogénica, se cultivaron células exponencialmente crecientes (70% de confluencia) en medio regular
 25 y se trataron con EDO-S101 a las concentraciones apropiadas, o

vehículo (concentración final de DMSO de 0.1%) durante 24 horas. La irradiación de células tumorales se realizó usando un acelerador lineal de 6 MV Elekta Synergy que usa un campo de irradiación clínicamente calibrado de 30 × 30 cm. Se colocaron placas de 2 cm de espesor de plexiglás por encima y por debajo de los matraces de cultivo celular llenos completamente con medio para compensar el efecto de acumulación. Los controles no irradiados se manejaron de forma idéntica a las células irradiadas con la excepción de la exposición a radiación. Después del tratamiento, se diluyeron las células a la concentración apropiada (1,000 células) y se volvieron a sembrar en un nuevo plato de cultivo de tejidos de 100 mm (por triplicado) y se incubaron durante 14 días. Al día 14 se retiró el medio y se fijaron las colonias con metanol: ácido acético (10:1, v/v) y se tiñeron con violeta de cristal. Se contaron las colonias que contenían más de 50 células. La eficiencia del cultivo (PE, por sus siglas en inglés) se calculó como el número de colonias observadas/el número de células aplicadas sobre la placa. Se calculó la fracción sobreviviente como el número de colonias formadas en las placas tratadas en comparación con el número formado en el testigo. Se analizaron las curvas de supervivencia usando el software estadístico SPSS (Chicago, IL) por medio de un ajuste de los datos mediante una regresión lineal estratificada ponderada, de acuerdo con la fórmula lineal cuadrática: $S(D)/S(O) = \exp(-(aD + bD^2))$.

Para la línea de células de glioblastoma MG251MG negativo a MGMT, se midió que la CI_{50} que será de 6.60 μM para EDO-S101

(comparada con 30 μM para bendamustina y 20 μM para temozolamida).

Para la línea celular de glioblastoma U87G negativo a MGMT, se midió la CI_{50} que será de 1.36 μM para EDO-S101 (comparada con 50 μM para bendamustina y 20 μM para temozolamida).

Para la línea celular de glioblastoma T98G de negativo a MGMT, se midió que la CI_{50} que será de 7.70 μM para EDO-S101 (comparada con 52 μM para bendamustina y >100 μM para temozolamida).

Como puede verse en la figura 10, el % de índice de supervivencia para las células de glioblastoma se redujo considerablemente cuando se usó radioterapia en combinación con una dosis de EDO-S101 (2.5 μM o 5 μM) en comparación con la radioterapia sola, en todas las líneas celulares de 3 GBM .

A continuación, se adoptó el procedimiento del ejemplo 3, s.c. Se prepararon modelos de xenoinjerto de GBM en ratones usando las líneas celulares GBM U251 y U87.

Los ratones U251 preparados como antes se sometieron a radioterapia (2 Gy durante 5 días consecutivos), tratamiento con EDO-S101 (60 mg/kg intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del ciclo de tratamiento) o control solamente. Antes de cualquier irradiación, los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (25 mg/ml)/xilazina (5 mg/ml). Los ratones portadores de tumores anestesiados recibieron una irradiación focal a la dosis de 2Gy durante 5 días consecutivos. Se administró la irradiación usando un

acelerador lineal de rayos X a una velocidad de dosis de 200 cGy/min a temperatura ambiente. Todos los ratones estaban protegidos con un aparato de plomo especialmente diseñado para permitir la irradiación a la pata trasera derecha. Los ratones se mantuvieron bajo estas condiciones hasta que toda la irradiación terminó.

Se realizó un estudio de la progresión del GBM de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 3. En la figura 1 se muestra una gráfica de tiempo a probabilidad de progresión (%) contra tiempo. A partir de esto, es evidente que el tiempo de progresión para los ratones tratados con EDO-S101 es considerablemente más largo que el observado para los tumores tratados con radioterapia.

En un experimento de seguimiento, los ratones U251 preparados de la misma manera fueron sometidos al tratamiento convencional actual de radioterapia y temozolomida (2 Gy durante 5 días consecutivos y 16 mg/kg durante 5 días consecutivos, po), tratamiento con EDO-S101 (60 mg/kg, intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del ciclo de tratamiento), tratamiento con EDO-S101 y radioterapia (2 Gy durante 5 días consecutivos y 60 mg/kg, intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del ciclo de tratamiento) o control. En la figura 12 se muestra una gráfica del tiempo a probabilidad de progresión (%) contra tiempo. A partir de esto, es evidente que el tiempo de progresión para los ratones tratados con EDO-S101 y radioterapia es significativamente más largo que el observado para los tumores tratados con EDO-S101 solo. Además, el

tiempo de progresión para la combinación de radioterapia y EDO-S101 fue significativamente más largo que el observado para los tumores tratados con radioterapia y temozolomida, el tratamiento convencional actual.

5 Se siguió la misma secuencia de experimentos, pero esta vez con los modelos de xenoinjerto s.c. de GBM en ratones preparados usando la línea celular GBM U87. En un primer experimento, los ratones U87 preparados como antes se sometieron a radioterapia (2 Gy durante 5 días consecutivos), tratamiento con EDO-S101 (60
10 mg/kg intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del ciclo de tratamiento) o control solamente. Se realizó un estudio de la progresión del GBM. Una gráfica del tiempo a probabilidad de progresión (%) contra tiempo se muestra en la figura 13. A partir de esto, es evidente que el tiempo de progresión para los ratones tratados con EDO-S101
15 (referido en la figura 13 como NL101) es considerablemente más largo que el observado para los tumores tratados con radioterapia.

En un experimento de seguimiento similar como el usado para los ratones U251, los ratones U87 preparados de la misma manera se sometieron a la radioterapia de tratamiento convencional actual y
20 temozolomida (2 Gy durante 5 días consecutivos y 16 mg/kg durante 5 días consecutivos), tratamiento con EDO-S101 (60 mg/kg, intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del ciclo de tratamiento), tratamiento con EDO-S101 y radioterapia (2 Gy durante 5 días consecutivos y 60 mg/kg, intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del
25 ciclo de tratamiento) o control. En la figura 14 se muestra una gráfica

del tiempo a probabilidad de progresión (%) contra tiempo. A partir de esto, es evidente que el tiempo de progresión para los ratones tratados con EDO-S101 y radioterapia es significativamente más largo que el observado para los tumores tratados con EDO-S101 solo. Además, el tiempo de progresión para la combinación de radioterapia y EDO-S101 fue significativamente más largo que el observado para radioterapia y temozolomida, el tratamiento convencional actual. También debe observarse que el tiempo de progresión observado para los ratones U87 tratados con EDO-S101 solo fue en realidad mayor que el alcanzado con el tratamiento combinado de radioterapia y temozolomida.

El tiempo de progresión de los tumores se aumentó de aproximadamente 17-18 días para el control para el modelo de xenoinjerto de ratón U251G, a 42 días con una combinación de radioterapia y temozolamida a más de 50 días para EDO-S101 solo (significación $P=0.924$) a significativamente más de 50 días para una combinación de EDO-S101 y radioterapia (significación $P=0.0359$).

Se encontró que el tiempo de progresión de los tumores se aumentó de aproximadamente 15 días para el control para el modelo de xenoinjerto de ratón U87G, a 35 días con una combinación de radioterapia y temozolamida a 40 días para EDO-S101 solo (significación $P=2372$) a significativamente más de 50 días para una combinación de EDO-S101 y radioterapia (significación $P=0.0001$).

Ejemplo 5 Evaluación histológica de tumores: modelo ortotópico de células transfectadas con U251-luciferasa

Los ratones transfectados isotópicamente con U251-luciferasa de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 3 se trataron con radioterapia (2 Gy durante 5 días consecutivos), temozolomida (16 mg/kg durante 5 días consecutivos, po), radioterapia y temozolomida (2 Gy durante 5 días consecutivos y 16 mg/kg durante 5 días consecutivos, po), EDO-S101 (60 mg/kg, intravenosamente a los días 1, 8 y 15 del ciclo de tratamiento) o vehículo de control.

El crecimiento tumoral intracraneal se supervisó con el sistema de imagenología Hamamatsu (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Se anestesiaron los ratones con 2% a 4% de isofluorano (Baxter, Deerfield, IL, USA) seguido por inyecciones intraperitoneales de 150 mg/kg de d-luciferina (In vivo Imaging Solutions). Se midieron cinco animales al mismo tiempo y se ajustó la cámara luminiscente a 1 minuto de exposición, clasificación media, 1 f/paro, filtro de excitación bloqueada y filtro de emisión abierta. Se ajustó la cámara fotográfica a 2 s de exposición, clasificación media, y 8 f/paro. El campo de visión se fijó a 22 cm para capturar cinco ratones a la vez. Las imágenes en serie se tomaron semanalmente usando ajustes idénticos. Se cuantificó la intensidad de la bioluminiscencia usando el software Living Image (Caliper Life Sciences).

Antes de cualquier irradiación, se anestesiaron los ratones con una mezcla de ketamina (25 mg/ml)/xilazina (5 mg/ml). Los ratones portadores de tumor anestesiados recibieron una irradiación focal a la dosis de 2 Gy durante 5 días consecutivos. La irradiación se

administró usando un acelerador lineal de rayos X a una velocidad de dosis de 200 cGy/min a temperatura ambiente. Todos los ratones estaban protegidos con un aparato de plomo especialmente diseñado para permitir la irradiación a la pata trasera derecha. Los ratones se mantuvieron en estas condiciones hasta que toda la irradiación terminó.

Todas las imágenes se obtuvieron en el plano transversal usando las siguientes secuencias: secuencia turbo espín eco (TSE, por sus siglas en inglés) ponderada a T2 transversal (tiempo de repetición [TR] tiempo msec/eco [TE] msec) 6766/120, número de señal adquirida 4, matriz de 192 x 192) aplicada con un espesor de sección de 0.9 mm, un espacio de intersección de 0.0 mm y un ángulo de inclinación de 160°. El campo de visión fue 36 x 60 mm², que incluía el tumor en su totalidad con un tamaño de voxel resultante de 0.3 x 0.3 x 1.0 mm³.

Se resumieron las variables continuas como desviación media y convencional (SD, por sus siglas en inglés) o como mediana y 95% de CI para la mediana. Para las variables continuas no distribuidas normalmente, se establecieron las comparaciones estadísticas entre los grupos control y tratados mediante la modalidad de las pruebas de Kruskal-Wallis. Para las variables continuas normalmente distribuidas, se establecieron comparaciones estadísticas entre los grupos control y tratados mediante la modalidad de la prueba de ANOVA o mediante la prueba t de Student para datos no pareados (para dos comparaciones).

50 días después del comienzo de los diferentes regímenes de tratamiento, se sacrificaron los ratones y se visualizaron las lesiones intracraneales finales en los ratones sometidos a tratamiento con el control, EDO-S101, temozolomida y radioterapia y temozolomida. Los resultados se muestran en las figuras 15 y 16. Se obtuvieron resultados similares tanto con los estudios con EDO-S101 como con temozolomida, mostrando ambos 5 de 13 ratones con tumores de algún grado (38.5%) en comparación con 8 de 11 (72.7%) en el control. Sin embargo, solo 1 de los 13 de los ratones tratados con EDO-S101 mostró una lesión grande, mientras que 2 de los 13 ratones tratados con temozolomida mostraron lesiones grandes. En el estudio de radioterapia y temozolomida, solo 2 de los 11 ratones (18.2%) mostraron lesiones al final del estudio, aunque ambas fueron grandes lesiones. Puede concluirse de esto que EDO-S101 es altamente eficaz en la prevención de la propagación de los GBM.

La eficacia de EDO-S101 en la prevención de la propagación de los GBM se enfatiza aún más en la figura 17, que muestra una gráfica de probabilidad de supervivencia (%) contra tiempo (días). La probabilidad de supervivencia para los ratones tratados con EDO-S101 fue significativamente mayor que la de los tratados con radioterapia o temozolomida. Sólo los ratones tratados con una combinación de radioterapia y temozolomida mostraron una mayor probabilidad de supervivencia general que EDO-S101 solo.

Ejemplo 6 Evaluación *in vivo* de EDO-S101 en modelos murinos para linfoma del CNS primario

Se repitió el procedimiento del ejemplo 3, excepto que los modelos murinos se crearon con 1×10^5 células de linfoma OCI-LY10B transfectadas con luciferasa para crear un modelo de linfoma del CNS primario. Se administró EDO-S101 (60 mg/kg de peso corporal), bendamustina (50 mg/kg de peso corporal) y el control se administró intravenosamente a través de una vena de la cola para separar grupos de ratones de prueba en los días +4, +11 y +18 después de la implantación intracerebral de las células de linfoma OCI-LY10B. Tanto EDO-S101 como bendamustina suprimieron significativamente el crecimiento tumoral y prolongaron la supervivencia mediana de 62 días y 54 días respectivamente en comparación con 48 días en controles sin tratamiento (ver las figuras 18a y 18b). EDO-S101, por lo tanto, parece ser un tratamiento prometedor para el linfoma del CNS primario.

Ejemplo 7 Evaluación *in vivo* de EDO-S101 en modelos murinos para cáncer de mama triple metastásico del cerebro

Se repitió el procedimiento del ejemplo 3, excepto que los modelos murinos se crearon con 1×10^5 células de cáncer de mama MB-468 transfectadas con luciferasa para crear un modelo de linfoma del CNS primario. Se administró EDO-S101 (60 mg/kg de peso corporal), bendamustina (50 mg/kg de peso corporal) y el control se administró intravenosamente a través de una vena de la cola para separar grupos de ratones de prueba en una dosis única en el día +4 después de la implantación intracerebral de las células de cáncer de mama MB-468. EDO-S101 mostró una actividad terapéutica

significativa con supresión del crecimiento tumoral y prolongación de la supervivencia con supervivencia mediana de 71 días en comparación con 62 días para bendamustina y 55 días para controles sin tratamiento (ver las figuras 19a y 19b). EDO-S101, por lo tanto, parece ser un tratamiento particularmente prometedor para el cáncer cerebral metastásico.

En conclusión, los experimentos demuestran que la capacidad de EDO-S101 para pasar a través de la barrera hematoencefálica es muy buena. Esto hace que sea un candidato prometedor para el tratamiento de los cánceres cerebrales. Los datos experimentales muestran además que es activo no solo contra los GBM negativos a MGMT pero también los GBM positivos a MGMT, haciéndolo muy prometedor como un tratamiento terapéutico para los GBM positivos a MGMT y otros tumores cerebrales astrocíticos positivos a MGMT ya que no se ha desarrollado terapia para estos . También muestra que prolonga significativamente la supervivencia mediana en casos tanto de linfoma del CNS primario y cánceres cerebrales metastásicos, convirtiéndose de nuevo en un candidato terapéutico muy prometedor para ambas afecciones. Los datos también muestran que cuando EDO-S101 se administró en combinación con radioterapia, entonces muestra una actividad significativamente mejorada en comparación con EDO-S101 solo en el tratamiento de GBM.