

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 411**

51 Int. Cl.:

A61K 51/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2010 PCT/US2010/038294**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10144788**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010 E 10786904 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 2440253**

54 Título: **Compuestos alquifosfolipídicos para el tratamiento de cáncer y obtención de imágenes y detección de células madre cancerosas**

30 Prioridad:

12.06.2009 US 186600 P

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

17.12.2020

73 Titular/es:

**CELLECTAR, INC. (100.0%)
 3301 Agriculture Drive
 Madison, WI 53716, US**

72 Inventor/es:

**WEICHERT, JAMEY, P.;
 PINCHUK, ANATOLY;
 KANDELA, IRAWATI;
 LONGINO, MARC y
 CLARKE, WILLIAM, R.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 799 411 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

Compuestos alquilfosfolipídicos para el tratamiento de cáncer y obtención de imágenes y detección de células madre cancerosas

Antecedentes de la invención

5 Las células madre, que poseen la capacidad única de experimentar autorrenovación y diferenciación en células específicas de tejido, dan lugar a todos los tejidos del cuerpo. A diferencia de las células madre embrionarias que pueden diferenciarse en muchos tipos celulares diferentes, las células madre específicas de tejido solo pueden formar células únicas para un tejido. Los avances recientes en las técnicas de biología molecular de células madre han permitido a los investigadores examinar el concepto de que un tumor maligno puede formarse y mantenerse debido a la presencia de un pequeño número de células madre específicas del cáncer.

10 Las células madre pueden renovarse a sí mismas. Se sabe que este proceso de autorrenovación de todas las células madre, incluidas las células madre tumorales, está regulado de manera muy estricta. Muchos informes en los últimos años han confirmado que se han encontrado pequeñas poblaciones de células madre cancerosas en una variedad de cánceres que incluyen glioma, carcinoma de mama, páncreas, ovario, hepatocelular, y melanoma, por nombrar algunos. Además, también se ha notificado ampliamente que los actuales agentes quimioterapéuticos contra el cáncer que pueden destruir con éxito células tumorales diferenciadas en realidad son ineficaces frente a la pequeña población de células madre cancerosas, lo que puede ser un factor que contribuye a la regeneración de las células cancerosas después de la quimioterapia. Estos agentes actúan inhibiendo una amplia variedad de mecanismos conocidos de señalización celular, regulación del crecimiento y muerte celular dentro de estas células cancerosas normalmente diferenciadas. Varios estudios han sugerido que la ineficacia a largo plazo de los agentes de quimioterapia contra las células madre cancerosas puede deberse a su falta de penetración en estas células. Aunque al principio del desarrollo, esta hipótesis puede explicar al menos parcialmente la regeneración de las células tumorales después de la quimioterapia.

25 Debido a su naturaleza, la radiación puede proporcionar un mayor grado de eficacia para matar células madre cancerosas. Aunque determinados tumores pueden tratarse eficazmente con radiación de haz externo, en muchos casos, los tumores reaparecen en un momento posterior. Además de la quimiorresistencia de las células madre cancerosas, ahora se sabe que las células madre del glioma también son el 30% más radorresistentes que las células normales del glioma. Este hallazgo se basa en la radiación aplicada a través de un haz externo. Los compuestos radioterapéuticos administrados por vía sistémica que pueden seleccionar como diana células cancerosas normalmente diferenciadas todavía pueden tener una ventaja significativa sobre los compuestos quimioterapéuticos debido a su capacidad de destrucción colateral, en donde la radiación que emana de células tumorales circundantes tiene la capacidad de destruir una célula madre solitaria a través de un efecto de "fuego cruzado" (el efecto de "fuego cruzado" es una teoría de que los compuestos radiactivos pueden destruir tanto las células cancerosas a las que se unen como las células tumorales adyacentes).

35 Además, la radioterapia administrada por vía sistémica proporciona una exposición a la radiación prolongada y continua que parece ser más eficaz en la destrucción de células tumorales que la radioterapia externa intermitente. Es incluso más probable que si un agente radioterapéutico administrado por vía sistémica pudiera realmente seleccionar como diana células madre cancerosas y penetrar su membrana, el agente radioterapéutico tendría una mejor oportunidad de destruir las células madre cancerosas y prevenir su eventual regeneración.

40 La solicitud de patente internacional WO2005/084716 se refiere a un método para detectar y localizar cáncer de pulmón usando un análogo fosfolipídico específico.

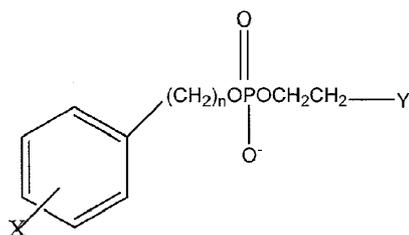
Diehn *et al.* (Seminars in radiation oncology, Volumen 19 (2), 1 de abril de 2009, páginas 78-86) se refiere al tratamiento del cáncer y afirma que un conjunto de pruebas creciente indica que las subpoblaciones de células madre cancerosas (CSC) impulsan y mantienen muchos tipos de neoplasias humanas.

45 La técnica anterior no divulga ni sugiere diagnosticar cáncer mediante la obtención de imágenes de una población de células madre cancerosas *in vivo* administrando a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, en donde dicho compuesto penetra en células madre cancerosas.

50 En consecuencia, existe la necesidad de agentes radioterapéuticos que puedan tratar el cáncer por sí mismos o en combinación con radioterapia de haz externo. Además, existe la necesidad de nuevos métodos para identificar células madre, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Breve compendio de la invención

55 La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier materia que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento o diagnóstico se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o para diagnóstico. En un aspecto, esta invención se refiere a un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I



Fórmula I

donde X es un isótopo de yodo; n es un número entero entre 12 y 30; e Y se selecciona del grupo que comprende N^+H_3 , $HN^+(R)_2$, N^+H_2R y $N^+(R)_3$, en donde R es un sustituyente de alquilo o arilalquilo,

- 5 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I,

en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado es suficiente para penetrar en dichas células madre cancerosas y en donde se reduce una población de dichas células madre cancerosas.

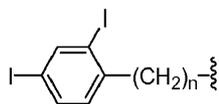
- 10 La cantidad terapéuticamente eficaz que es suficiente para penetrar en dichas células madre cancerosas está preferiblemente entre 0,21-21 mg (equivalente a un intervalo de dosis másica total de 7-700 mCi) y entre 0,03-0,21 mg/kg (equivalente a 1-7 mCi/kg, por intervalo de dosis en peso).

Para una terapia en seres humanos, un isótopo preferido de yodo es ^{131}I , aunque también pueden usarse otros isótopos radiactivos, incluyendo ^{123}I , ^{124}I e ^{125}I .

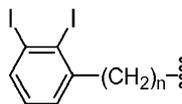
- 15 En una realización de la invención, puede utilizarse el compuesto alquilfosfolipídico marcado con un isótopo no radiactivo ("frío") de yodo (por ejemplo, ^{127}I) para tratar células madre cancerosas.

En la realización más preferida, el compuesto radiomarcado es CLR1404 (18-(p-yodofenil)octadecilfosfocolina) radiomarcado con ^{131}I .

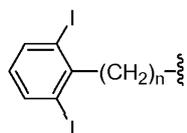
- 20 Además, se divulgan compuestos alquilfosfolipídicos que tienen más de un yodo radiactivo. Algunas estructuras representativas son las siguientes:



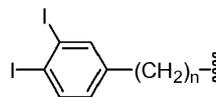
ω -(2,4-di-yodofenil)-alquil-



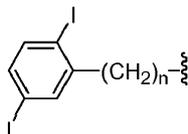
ω -(2,3-di-yodofenil)-alquil-



ω -(2,6-di-yodofenil)-alquil-



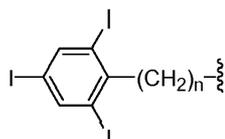
ω -(3,4-di-yodofenil)-alquil-



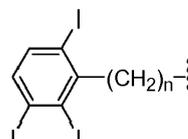
ω -(2,5-di-yodofenil)-alquil-

25

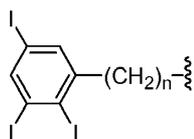
y



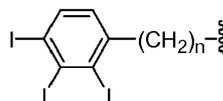
ω -(2,4,6-tri-yodofenil)-alquil-



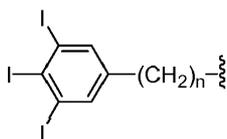
ω -(2,5,6-tri-yodofenil)-alquil-



ω-(2,3,5-tri-yodofenil)-alquil-



ω-(2,3,4-tri-yodofenil)-alquil-



ω-(3,4,5-tri-yodofenil)-alquil-

- 5 La parte de la molécula después de la línea ondulada vertical es la misma que en las moléculas con un yodo unido al anillo de fenilo.

En una realización, el cáncer es cáncer sólido.

- 10 En una realización, los cánceres sólidos se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, glioma, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, melanoma, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, sarcoma y cáncer de estómago.

En otra realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos alquifosfolipídicos radiomarcados tal como se describe en la aplicación formulada para su uso en el tratamiento del cáncer en donde los compuestos alquifosfolipídicos radiomarcados penetran en células madre cancerosas.

- 15 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto alquifosfolipídico radiomarcado de fórmula I tal como se definió anteriormente, para su uso en un método de diagnóstico de cáncer mediante la obtención de imágenes de una población de células madre cancerosas *in vivo* que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de fórmula I, en donde dicho compuesto alquifosfolipídico radioactivo penetra en dichas células madre cancerosas.

- 20 Para la obtención de imágenes en seres humanos, un isótopo preferido de yodo es ¹²⁴I, aunque también pueden usarse otros isótopos radiactivos, incluyendo ¹²³I y ¹³¹I.

En una realización preferida, el compuesto alquifosfolipídico radiomarcado es CLR1404 (18-(p-yodofenil)octadecilfosfocolina) radiomarcado con ¹²⁴I.

- 25 La obtención de imágenes puede realizarse a través de un barrido híbrido, utilizando una modalidad de obtención de imágenes funcional, tal como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o la tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con la tomografía computarizada (CT) y/o técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), y combinaciones de las mismas.

En otras realizaciones, la invención proporciona métodos de marcado *ex vivo* o *in vitro* de células madre cancerosas que comprende administrar a las células sospechosas de comprender células madre cancerosas una cantidad eficaz de un compuesto alquifosfolipídico radiomarcado de fórmula I.

30 Descripción detallada de la invención

- Se han desarrollado varias series de compuestos alquifosfolipídicos radiomarcados selectivos de tumores para la obtención de imágenes, caracterización, y tratamiento de tumores malignos. Hasta el momento, el compuesto principal, CLR1404, ha demostrado una absorción sorprendente y propiedades de retención selectiva prolongada en más de cincuenta modelos tumorales de ser humano y tumorales de roedor espontáneos y de xenoinjerto sólidos. A diferencia de ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa (¹⁸F-FDG), el patrón de oro actual para obtención de imágenes oncológicas, CLR1404 no se localiza en lesiones benignas o premalignas o en lesiones inflamatorias. Se sabe que la señalización celular y la regulación de los fosfolípidos, incluyendo fosfolipasa-D y sus isoformas, así como el homólogo de fosfatasa y tensina deletado de las rutas del cromosoma-10 (PTEN) y fosfato de fosfatidilinositol (PIPn), están directamente involucradas en la regulación aguas arriba de muchas rutas oncogénicas clave. Ahora se tienen pruebas contundentes de que la absorción y retención de nuestros análogos de PLE se debe al menos en parte a estas rutas de regulación aguas arriba y señalización de células cancerosas. Se ha demostrado que otros elementos no radiactivos de la clase de moléculas "alquifosfolipídicas antitumorales" inducen la apoptosis de las células tumorales mediante la inhibición de la señalización aguas abajo dependiente de AKT; el mismo mecanismo que se cree que es importante para potenciar la supervivencia de células madre malignas en respuesta a la quimioterapia o la radiación.

- 45 Esta invención se refiere al descubrimiento de que las propiedades únicas de los compuestos alquifosfolipídicos, especialmente CLR1404, incluyendo su retención selectiva prolongada en células malignas, y su capacidad para

inhibir mecanismos de supervivencia dependientes de AKT, pueden utilizarse para tratar y/o detectar células madre cancerosas.

Para los fines de la presente invención, el término "tratar" se refiere a revertir, aliviar, inhibir o ralentizar el avance de la enfermedad, trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección.

El término "célula madre cancerosa" se refiere a una célula con capacidad para iniciar tumores y sustentar tumores.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente del compuesto para reducir el número de células madre cancerosas. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el cáncer específico que se está tratando, la fase del cáncer, la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidencia con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

El término "formas cristalinas" y los términos relacionados en el presente documento se refieren a las diversas modificaciones cristalinas de una sustancia dada, que incluyen, pero no se limitan a, polimorfos, solvatos, hidratos, cocristales y otros complejos moleculares, así como sales, solvatos de sales, hidratos de sales, otros complejos moleculares de sales, y polimorfos de los mismos.

Los compuestos de la invención abarcan cualquier versión deuterada de los compuestos.

Los compuestos de la invención pueden existir en diferentes formas isoméricas (por ejemplo, enantiómeros y distereoisómeros) y de enol. La invención contempla todos los isómeros de este tipo, tanto en forma pura como en mezcla, incluyendo mezclas racémicas.

Los compuestos de la invención abarcan sales farmacéuticamente aceptables de la porción de fosfocolina de los compuestos. Los compuestos de la invención también son preferiblemente sales internas (zwitteriones) en sí mismas.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de principios activos que se preparan con ácidos relativamente no tóxicos. Las sales de adición de ácido pueden obtenerse poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen los derivados de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como el acético; propiónico; isobutírico; maleico; malónico; benzoico; succínico; subérico; fumárico; mandélico; ftálico; bencenosulfónico; toluensulfónico, incluyendo *p*-toluensulfónico, *m*-toluensulfónico y *o*-toluensulfónico; cítrico; tartárico; metanosulfónico. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galactunórico (véase, por ejemplo, Berge *et al.* J. Pharm. Sci. 66: 1-19 (1977)).

Tal como se usa en el presente documento, una sal o polimorfo que es "puro" es decir, sustancialmente libre de otros polimorfos, contiene menos de aproximadamente el 10% de uno o más de otros polimorfos, preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de uno o más de otros polimorfos, más preferiblemente menos de aproximadamente el 3% de uno o más de otros polimorfos, lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 1% de uno o más de otros polimorfos.

Los términos "polimorfos" y "formas polimórficas" y los términos relacionados en el presente documento se refieren a formas cristalinas de una molécula. Diferentes polimorfos pueden tener diferentes propiedades físicas tales como, por ejemplo, temperaturas de fusión, calores de fusión, solubilidades, velocidades de disolución y/o espectros vibracionales como resultado de la disposición o conformación de las moléculas en la red cristalina. Las diferencias en las propiedades físicas mostradas por los polimorfos afectan a parámetros farmacéuticos tales como la estabilidad de almacenamiento, la compresibilidad y la densidad (importante en la formulación y la fabricación del producto), y las velocidades de disolución (un factor importante en la biodisponibilidad). Pueden obtenerse polimorfos de una molécula mediante varios métodos, tal como se conoce en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, recristalización en estado fundido, enfriamiento en estado fundido, recristalización con disolvente, desolvatación, evaporación rápida, enfriamiento rápido, enfriamiento lento, difusión de vapor y sublimación.

El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a grupos hidrocarbonados alifáticos saturados monovalentes, particularmente, que tienen hasta aproximadamente 11 átomos de carbono, más particularmente como alquilo inferior, de desde 1 hasta 8 átomos de carbono y todavía más particularmente, desde 1 hasta 6 átomos de carbono. La cadena hidrocarbonada puede ser de cadena lineal o ramificada. Este término se ejemplifica por grupos tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-hexilo, *n*-octilo,

terc-octilo. El término "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. El término "alquilo" también incluye "cicloalquilo" tal como se define a continuación.

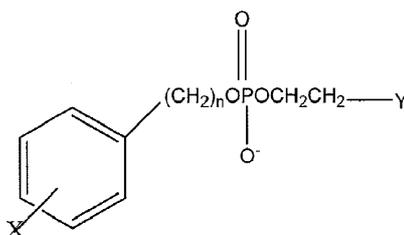
El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique de otro modo, una cadena lineal o ramificada estable, o un radical hidrocarbonado cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de desde uno hasta tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El/los heteroátomo(s) O, N y S pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo Si puede colocarse en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluyendo la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos, tal como, por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. También se incluyen en el término "heteroalquilo" aquellos radicales descritos con más detalle a continuación como "heteroalquileo" y "heterocicloalquilo".

"Ariilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático original. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero no se limitan a, grupos derivados de aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, *as*-indaceno, *s*-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenio, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno. Particularmente, un grupo ariilo comprende de desde 6 hasta 14 átomos de carbono.

El término "sujeto" se define en el presente documento para incluir animales tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a, primates (por ejemplo, seres humanos, monos, simios), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa un error aceptable para un valor particular determinado por un experto en la técnica, que depende en parte de cómo se mide o se determina el valor. En determinadas realizaciones, el término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro de 1, 2, 3 o 4 desviaciones estándar. En determinadas realizaciones, el término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro del 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,05% de un valor o intervalo dado.

Por lo tanto, en un aspecto, esta invención se refiere a un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I



Fórmula I

en donde X es un isótopo de yodo; n es un número entero entre 12 y 30; e Y se selecciona del grupo que comprende N^+H_3 , $\text{HN}^+(\text{R})_2$, $\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$ y $\text{N}^+(\text{R})_3$, en donde R es un sustituyente de alquilo o arilalquilo,

en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado es suficiente para penetrar en dichas células madre cancerosas y en donde se reduce una población de dichas células madre cancerosas.

La cantidad terapéuticamente eficaz que es suficiente para penetrar en dichas células madre cancerosas está preferiblemente entre 0,21-21 mg (equivalente a 7-700 mCi, intervalo de dosis másica total) y entre 0,03-0,21 mg/kg (equivalente a 1-7 mCi/kg, por intervalo de dosis en peso).

Estas cantidades se calcularon utilizando el valor de dosis másica total de producto farmacológico (CLR1401) actual de 0,15 mg/ml y un valor de concentración de actividad de 5,0 mCi/ml en la inyección.

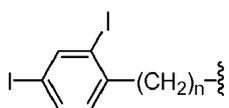
En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos alquilfosfolipídicos radiomarcados tal como se describe en la aplicación formulada para su uso en el tratamiento del cáncer en donde los compuestos alquilfosfolipídicos radiomarcados penetran en las células madre cancerosas.

En una realización preferida, la población de células madre cancerosas comprende células madre de los siguientes cánceres: glioma, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer renal, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer pancreático.

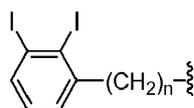
5 Para una terapia en seres humanos, un isótopo preferido de yodo es ^{131}I , aunque también pueden usarse otros isótopos radiactivos, incluyendo ^{123}I , ^{124}I y ^{125}I . En una realización, puede utilizarse un compuesto alquifosfolípido marcado con yodo "frío" (por ejemplo, ^{127}I) para tratar células madre cancerosas.

En la realización más preferida, el compuesto radiomarcado es CLR1404 (18-(p-yodofenil)octadecilfosfocolina) radiomarcado con ^{131}I .

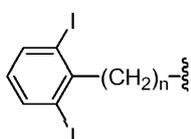
10 Además, los compuestos alquifosfolípidicos que tienen más de un yodo radioactivo pueden usarse para los propósitos de la presente descripción. Algunas estructuras representativas son las siguientes:



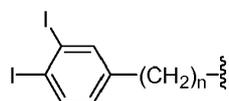
ω -(2,4-di-yodofenil)-alquil-



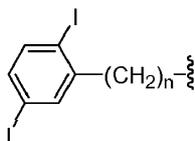
ω -(2,3-di-yodofenil)-alquil-



ω -(2,6-di-yodofenil)-alquil-



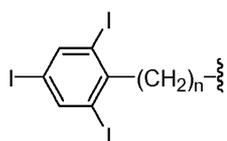
ω -(3,4-di-yodofenil)-alquil-



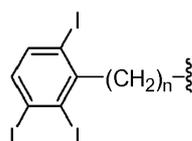
ω -(2,5-di-yodofenil)-alquil-

15

y

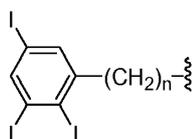


ω -(2,4,6-tri-yodofenil)-alquil-

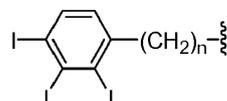


ω -(2,5,6-tri-yodofenil)-alquil-

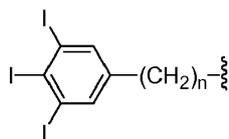
20



ω -(2,3,5-tri-yodofenil)-alquil-



ω -(2,3,4-tri-yodofenil)-alquil-



ω -(3,4,5-tri-yodofenil)-alquil-

25

La parte de la molécula después de la línea ondulada vertical es la misma que en las moléculas con un yodo unido al anillo de fenilo.

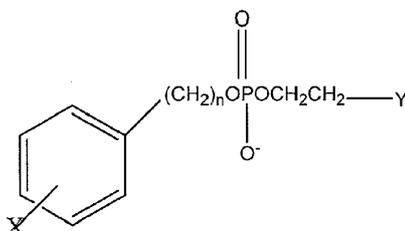
En otra realización, la invención también se refiere a una terapia de combinación, en donde la reducción de células madre cancerosas con compuestos alquilfosfolipídicos radiomarcados tiene lugar simultáneamente, posteriormente o antes de otro tratamiento.

5 En una realización preferida, el otro tratamiento se selecciona de radioterapia, quimioterapia, resección tumoral, terapias ablativas y tratamiento físico local basándose en frío (crio), calor (térmico), radiofrecuencia y microondas.

10 En algunas realizaciones de la invención, los métodos reivindicados potencian la radiosensibilidad de las células madre cancerosas. Esto se debe a que los compuestos de PLE, tal como se describe en la solicitud, pueden penetrar las células madre cancerosas a través de la absorción directa. Por lo tanto, la invención permite potenciar la dosis de radiación global suministrada a las células madre cancerosas mediante radioterapia. En una realización, la invención permite potenciar la dosis de radiación global suministrada a las células madre cancerosas mediante radioterapia en aproximadamente el 30%.

15 En otra realización, los métodos reivindicados pueden permitir destruir (o reducir la población de) células madre cancerosas sin ninguna radiación externa o cualquier otra terapia contra el cáncer. La destrucción de células madre cancerosas por los análogos de PLE descritos puede deberse a la absorción directa de los análogos de PLE en las células madre cancerosas y/o debido a los efectos colaterales de destruir células cancerosas vecinas.

En otra realización, la invención se refiere a un método de obtención de imágenes de una población de células madre cancerosas *in vivo* que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I



20 **Fórmula I**

en donde X es un isótopo de yodo; n es un número entero entre 12 y 30; e Y se selecciona del grupo que comprende N^+H_3 , $HN^+(R)_2$, N^+H_2R y $N^+(R)_3$, en donde R es un sustituyente de alquilo o arilalquilo,

en donde dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado penetra en dichas células madre cancerosas.

25 En una realización preferida, la población de células madre cancerosas comprende células madre de los siguientes cánceres: glioma, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer renal, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer pancreático.

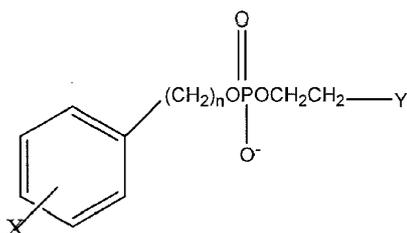
Para la obtención de imágenes en seres humanos, un isótopo preferido de yodo es ^{124}I , aunque también pueden usarse otros isótopos radiactivos, incluyendo ^{123}I y ^{131}I .

30 En la realización más preferida, el compuesto radiomarcado es CLR1404 (18-(p-yodofenil)octadecilfosfocolina) radiomarcado con ^{124}I .

Los compuestos de PLE que tienen más de un átomo de yodo unido al anillo de fenilo, tal como se describió anteriormente, también pueden usarse en los métodos de obtención de imágenes.

35 La obtención de imágenes puede realizarse a través de un barrido híbrido, utilizando una modalidad de obtención de imágenes funcional, tal como la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o la tomografía por emisión de positrones (PET) en combinación con la tomografía computarizada (CT) y/o técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), y combinaciones de las mismas.

En otra realización, la invención se refiere a un método de marcado de células madre cancerosas *ex vivo* o *in vitro* que comprende administrar a células sospechosas de comprender células madre cancerosas una cantidad eficaz de un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I



Fórmula I

en donde X es un isótopo de yodo; n es un número entero entre 12 y 30; e Y se selecciona del grupo que comprende N^+H_3 , $HN^+(R)_2$, N^+H_2R y $N^+(R)_3$, en donde R es un sustituyente de alquilo o arilalquilo,

- 5 en donde dichas células madre cancerosas están marcadas con dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado.

Los compuestos de PLE que tienen más de un átomo de yodo unido al anillo de fenilo, tal como se describió anteriormente, también pueden usarse en los métodos de marcado.

En algunas realizaciones, este método permite detectar y/o separar células madre cancerosas de otros tipos de células.

- 10 En otras realizaciones, los compuestos descritos pueden usarse para identificar células madre cancerosas *in vivo*, administrando los compuestos a un animal y luego identificando y/o cuantificando células madre de cualquier tipo en cualquier órgano o tejido. Estos métodos pueden usarse para facilitar el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades o para estudiar procesos fisiológicos en animales.

- 15 Los compuestos pueden administrarse a través de cualquier método adecuado, que incluye inyección, ingestión y administración tópica.

Los métodos descritos pueden comprender además una etapa de separar las células madre cancerosas de las células no cancerosas.

- 20 Además, estos métodos pueden usarse para monitorizar la respuesta a terapias que afectan el crecimiento de células madre en animales, incluyendo seres humanos. Las terapias pueden reducir el crecimiento de células madre o estimular el crecimiento de células madre.

Los siguientes ejemplos proféticos demuestran algunos aspectos de la invención. Los ejemplos no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

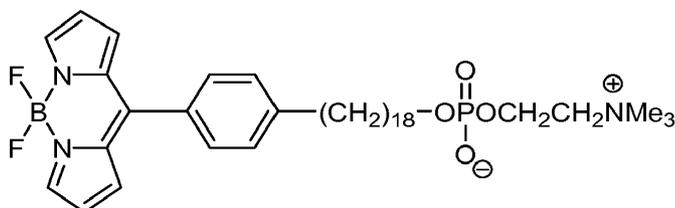
Ejemplos

Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

- 25 Someter a prueba CLR1501 *in vitro* para determinar si el compuesto se introduce en células madre cancerosas

Un objetivo de este experimento es determinar si un compuesto alquilfosfolipídico CLR1501 (una versión fluorescente de CLR1404) se introduce en células madre cancerosas en cultivo utilizando microscopía confocal.

CLR1501 tiene la siguiente estructura:



- 30 Se ha demostrado en estudios de cultivo celular que CLR1501 se absorbe preferentemente por una variedad de células tumorales en relación con sus células de tejido de huésped normales. El agente se asocia inicialmente con membranas celulares externas, se internaliza, y luego se asocia con otros orgánulos y membranas subcelulares. No parece introducirse en el núcleo incluso después de 24 horas.

- 35 Podría realizarse un experimento similar que utiliza CLR1501 para demostrar que los compuestos alquilfosfolipídicos pueden penetrar en las células madre cancerosas. Una comparación en tumores cerebrales, por ejemplo, consistiría en hacer una comparación paralela de la absorción de CLR1501 en células gliales cultivadas (células neuronales cerebrales normales), células tumorales de glioma normalmente diferenciadas y células madre cancerosas de glioma

enriquecidas (aisladas de gliomas humanos, separadas usando marcadores de células madre cancerosas, y hechas crecer en cultivo). Tras la exposición a CLR1501, las células de cada cohorte se eliminarían de sus entornos de cultivo y se someterían a obtención de imágenes de microscopía confocal de apilamiento en z a lo largo del tiempo y se cuantificaría la absorción del agente para identificar diferencias en la absorción total y las tasas de absorción, así como la retención.

5

Puede hacerse un experimento similar con CLR1404 radiomarcado con la determinación de la cantidad de compuesto que se retiene en los lisados de células madre expuestas.

Ejemplo 2

Someter a prueba CLR1404 *in vivo* para determinar si el compuesto se introduce en células madre cancerosas

10 Un objetivo de este experimento es determinar si ^{124}I -CLR1404 se introduce en células madre cancerosas *in vivo* utilizando barrido de microPET/CT/MRI.

Utilizando barrido híbrido de microPET/CT de nuestros modelos de ratones portadores de tumores, se puede monitorizar cuantitativamente la absorción y retención tumoral tridimensionalmente en modelos tumorales de roedores intactos, incluyendo xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos, así como modelos tumorales espontáneos de ratones y ratas.

15

Para evaluar la potencial absorción de CLR1404 en células madre cancerosas, utilizando el glioma como ejemplo, se realizaría barrido híbrido de microPET/CT/MRI *in vivo* de animales anestesiados con tumores cerebrales ortotópicos derivados de células madre de glioma humano. El aislamiento de estas células sería similar al descrito en el ejemplo 1, con la excepción de que las células madre tumorales se implantarían ortotópicamente en el cerebro del ratón. También se haría una comparación con gliomas normales de derivación de células no madre. Tras la obtención de imágenes *in vivo* utilizando ^{124}I -CLR1404 en varios puntos temporales de desde 0-7 días, los tumores se extirparían y explorarían *ex vivo* y luego el tumor se aislaría y se haría recuento de la radioactividad con el fin de comparar las proporciones de tumor con respecto a cerebro normal y también para comparar derivaciones tumorales.

20

Ejemplo 3

25 Someter a prueba CLR1404 *in vivo* para determinar si el compuesto reduce la cantidad de células madre cancerosas

Un objetivo de este experimento es determinar si ^{125}I - o ^{131}I -CLR1404 puede destruir células madre cancerosas y comparar la supervivencia de células de glioma normalmente diferenciadas.

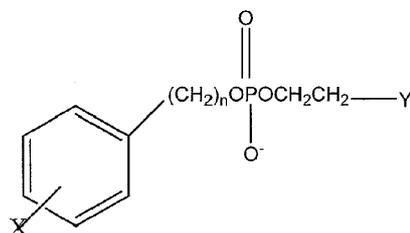
Puede utilizar el mismo modelo de glioma propuesto para los experimentos en los ejemplos 1 y 2. Sería deseable comparar la eficacia terapéutica de ambos ^{125}I -CLR1404 y ^{131}I -CLR1404. En consecuencia, las cohortes de ratones portadores de tumores cerebrales consistirían en operación simulada ($n = 3$), un glioma normalmente diferenciado ($n = 3$) y glioma derivado de células madre ($n = 6$). El tumor se confirmaría inicialmente de forma no invasiva con obtención de imágenes por MRI de campo alto antes de la administración del agente. Los animales recibirían una mezcla de agente de obtención de imágenes (^{124}I) y terapéutico (^{125}I o ^{131}I) en T_0 y se realizarían barridos hasta 4 días después de la inyección para determinar la focalización adecuada al tumor. Después de un período de tiempo predeterminado, los animales se sacrificarán, los tumores se extirparán, las células se digerirán y someterán a condiciones apropiadas de cultivo celular. Se cuantificará y comparará el crecimiento celular de las células de glioma regularmente diferenciadas, así como también los esferoides derivados de células madre de glioma, para determinar si existe efecto de destrucción diferencial para algún isótopo en cada población celular.

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I



Fórmula I

- 5 en donde X es un isótopo de yodo; n es un número entero entre 12 y 30; e Y se selecciona del grupo que comprende N^+H_3 , $HN^+(R)_2$, N^+H_2R y $N^+(R)_3$, en donde R es un sustituyente de alquilo o arilalquilo, para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado es suficiente para penetrar en dichas células madre cancerosas y en donde se reduce una población de dichas células madre cancerosas.
- 10
2. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho isótopo de yodo es ^{131}I .
3. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado es 18-(p-yodofenil)octadecilfosfolina y X es ^{131}I .
- 15
4. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho método comprende además otra terapia contra el cáncer seleccionada del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, resección tumoral, terapia ablativa, y tratamiento físico local basándose en frío (crio), calor (térmico), radiofrecuencia y microondas.
5. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I según se define en la reivindicación 1, para su uso en un método de diagnóstico de cáncer mediante la obtención de imágenes de una población de células madre cancerosas *in vivo* que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de fórmula I,
- 20 en donde dicho compuesto alquilfosfolipídico radioactivo penetra en dichas células madre cancerosas.
6. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 5, en donde dicha obtención de imágenes se realiza a través de un barrido híbrido utilizando tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) o tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada (CT) o técnicas de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).
- 25
7. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho isótopo de yodo es ^{124}I .
- 30
8. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado es 18-(p-yodofenil)octadecilfosfolina y X es ^{124}I .
9. Un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, en donde dicha población de células madre cancerosas comprende células madre de los siguientes cánceres: glioma, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer renal, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de páncreas.
- 35
10. Uso de un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento contra el cáncer según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 y 9.
- 40
11. Uso de un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 8, para la fabricación de un medicamento para su uso en un método de diagnóstico de cáncer mediante la obtención de imágenes de una población de células madre cancerosas *in vivo*, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 y 9.
- 45
12. Un método de marcaje de células madre cancerosas *ex vivo* o *in vitro* que comprende administrar a células sospechosas de comprender células madre cancerosas una cantidad eficaz de un compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado de fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 8,

en donde dichas células madre cancerosas están marcadas con dicho compuesto alquilfosfolipídico radiomarcado.

- 5
13. El método de la reivindicación 12, en donde dichas células madre cancerosas comprenden células madre de uno o más de los siguientes cánceres: glioma, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer renal, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de páncreas.
 14. El método de la reivindicación 12, que comprende además una etapa de distinguir dichas células madre cancerosas de células no cancerosas.
 15. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, su uso según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, o método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz o la cantidad eficaz es de desde 0,03 hasta 0,21 mg/kg.
- 10