



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 898**

51 Int. Cl.:

A61K 31/18 (2006.01) **A61K 31/343** (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01) **A61K 31/404** (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01) **A61K 31/517** (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06715261 .1**

96 Fecha de presentación : **28.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1859793**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2007**

54

Título: **Nuevo uso combinado de un compuesto de sulfonamina en el tratamiento de cáncer.**

30

Prioridad: **28.02.2005 JP 2005-54111**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.07.2011

73

Titular/es: **EISAI R&D MANAGEMENT Co., Ltd.**
6-10, Koishikawa 4-chome
Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, JP

72

Inventor/es: **Owa, Takashi;**
Ozawa, Yoichi;
Semba, Taro y
Wakabayashi, T.

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 362 898 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

Novedoso uso combinado de un compuesto de sulfonamida en el tratamiento de cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica novedosa, a un kit y a su uso para tratar cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Ejemplos de fármacos para quimioterapia convencionalmente usados para el cáncer incluyen agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, antimetabolitos tales como metotrexato y fluorouracilo, antibióticos tales como adriamicina, mitomicina, bleomicina, taxol derivado de plantas, vincristina y etopósido, y complejos metálicos tales como cisplatino. Sin embargo, ninguno de ellos tiene efectos antitumorales suficientes y, por tanto, hay una fuerte necesidad de desarrollar un agente antitumoral novedoso.

Recientemente se ha informado de un compuesto de sulfonamida como agente antitumoral útil ⁽¹⁻⁵⁾. En particular, N-(3-cloro-1H-indol-7-il)-4-sulfamoylbencenosulfonamida (también denominada en lo sucesivo "E7070"), N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida (también denominada en lo sucesivo "E7820"), N-[[[4-clorofenil)amino]carbonil]-2,3-dihidro-1H-indeno-5-sulfonamida (también denominada en lo sucesivo "LY186641"), N-[[[3,4-diclorofenil)amino]carbonil]-2,3-dihidrobenzofurano-5-sulfonamida (también denominada en lo sucesivo "LY295501"), N-(2,4-diclorobenzoil)-4-clorofenilsulfonamida (también denominada en lo sucesivo "LY-ASAP"), N-(2,4-diclorobenzoil)-5-bromotiofeno-2-sulfonamida (también denominada en lo sucesivo "LY573636") y 2-sulfanilamida-5-cloroquinoxalina (también denominada en lo sucesivo "CQS") son activas contra diversos tipos de tumores y, por tanto, son muy útiles.

Por otra parte, como sustancias que tienen un actividad inhibitoria de EGF se ha informado de inhibidores de la cinasa del EGFR 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-(3-(4-morfolino)propoxi-quinazolina) (también denominada en lo sucesivo "gefitinib") y 4-(3-etinilfenilamino)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-quinazolina (también denominada en lo sucesivo "erlotinib") y un anticuerpo anti-EGFR cetuximab ⁽⁶⁻⁹⁾.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha informado de la presencia ni del tipo de efectos resultantes de combinar estos compuestos.

35 Recientemente se establecieron procedimientos para detectar simultáneamente niveles de expresión de múltiples genes usando diversas micromatrices de ADN. Por tanto, las micromatrices de ADN se han usado para diversos fines ^(10 y 11). Además, se han hecho varios informes sobre el uso de micromatrices de ADN (en parte, hay una macromatriz que usa filtros de membrana) para examinar cambios en las expresiones génicas tras el uso de fármacos anticancerígenos contra células tumorales ⁽¹²⁻¹⁴⁾. Estos informes muestran que la variabilidad del análisis de expresión génica es altamente útil en el estudio exhaustivo de la comparación característica entre una pluralidad de poblaciones de células, los cambios biológicos en células producidos por el tratamiento de fármaco o similares al nivel molecular.

45 Además, también se han hecho informes para el análisis de perfiles de expresión génica de 60 tipos de paneles de líneas celulares de cáncer del Instituto Nacional del Cáncer Americano para la reclasificación de estas líneas celulares y el examen de sus características ⁽¹⁵⁾ y para la discusión referente a la relación entre los perfiles de expresión génica de estos 60 tipos de paneles de líneas celulares de cáncer y la sensibilidad de cada línea celular a diversos fármacos anticancerígenos ⁽¹⁶⁾.

50 **Referencias**

- (1) Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 7-165708.
- (2) Publicación internacional nº WO00/50395.
- (3) Publicación de patente europea nº 0222475.
- 55 (4) Publicación internacional nº WO02/098848.
- (5) Publicación internacional nº WO2003/035629.
- (6) Publicación internacional nº WO96/33980.
- (7) Patente japonesa nº 3040486.
- (8) Patente japonesa nº 3088018.
- 60 (9) Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2-291295.
- (10) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Science, 1995, 270, 467-70.
- (11) Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang C., Kobayashi, M., Horton, H. Brown, E.L., Nature Biotechnology, 1996, 14, 1675-1680.
- (12) Rhee CH, Ruan S, Chen S, Chenchik A, Levin VA, Yung AW, Fuller GN, Zhang W, Oncol Rep, 1999, 6, 393-401.
- 65 (13) Zimmermann J, Erdmann D, Lalande I, Grossenbacher R, Noorani M, Furst P, Oncogene, 2000, 19,

2913-20.

(14) Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, Elkahloun AG, Bittner ML, Meltzer PS, Trent JM, Dalton WS, Chin KV, Cancer Res, 2000, 4161-6.

(15) Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO, Nat Genet, 2000, 24, 227-35.

(16) Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN, Nat Genet, 2000, 24, 236-44.

Divulgación de la invención

La presente invención se logró considerando las circunstancias descritas anteriormente. El problema que va a resolverse por la invención es encontrar una composición farmacéutica y un kit que tengan una sorprendente actividad antitumoral, y una composición farmacéutica o kit para uso en el tratamiento de cáncer.

Con el fin de resolver el problema anterior, los presentes inventores han llevado a cabo un profundo examen como resultado del cual se encontró que el uso combinado de E7820 y gefitinib mostraba un efecto antiproliferativo sinérgico estadísticamente significativo (por Isobologram) en un ensayo de proliferación celular (*in vitro*). Además, se encontró que el uso combinado de E7820 y gefitinib o erlotinib mostraba un efecto antitumoral sinérgico estadísticamente significativo (por ANOVA bidireccional) en un modelo de trasplante subcutáneo (*in vivo*) de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico. Además, el uso combinado de E7820 y gefitinib o erlotinib mostró un sorprendente efecto antitumoral que no puede observarse con gefitinib ni erlotinib solos. Se encontró que el uso combinado de E7820 y cetuximab mostraba un sorprendente efecto antitumoral.

Además, se encontró que el uso combinado de E7070 y gefitinib o erlotinib mostraba un efecto antiproliferativo sinérgico estadísticamente significativo (por Isobologram).

En experimentos usando micromatrices de ADN y paneles de líneas celulares de cáncer se encontró que los patrones de alteración genética y las actividades antiproliferativas de E7070, E7820, LY186641, LY295501, LY573636, CQS y combinaciones de las mismas mostraban una alta correlación. En un ensayo para determinar la actividad antiproliferativa se encontró que una línea de células cancerosas resistente a E7070 mostraba resistencia cruzada a E7820, LY186641, LY295501, LY-ASAP, LY573636 o CQS. A partir de estos resultados los presentes inventores han encontrado que E7070, E7820, LY186641, LY295501, LY-ASAP, LY573636, CQS y combinaciones de las mismas tienen los mismos mecanismos de acción o similares que producen las mismas alteraciones y efectos de genes o similares.

Por consiguiente, se considera que E7070, E7820 o una combinación de las mismas muestra una buena actividad antitumoral cuando se usan en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. Por tanto, E7070, E7820 o una combinación de las mismas, y una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF seleccionada de gefitinib, erlotinib o cetuximab, pueden usarse como una composición farmacéutica útil o un kit que puede usarse para tratamiento de cáncer.

Por tanto, la presente invención se refiere a:

(1) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de sulfonamida en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF, en la que el compuesto de sulfonamida es:

N-(3-cloro-1H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida, N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida o una sal farmacológicamente aceptable de las mismas o un solvato de las mismas y en la que la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF es gefitinib, erlotinib o cetuximab.

(2) Un kit que comprende un conjunto de una formulación que comprende un compuesto de sulfonamida como se define en (1) y una formulación que comprende una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en (1).

(3) Uso de un compuesto de sulfonamida como se define en (1) para producir una composición farmacéutica para uso en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en (1) en el tratamiento de cáncer.

(4) Uso de una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en (1) para producir una composición farmacéutica para uso en combinación con un compuesto de sulfonamida como se define en (1) en el tratamiento de cáncer.

(5) Un compuesto de sulfonamida como se define en (1) para uso en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en (1) en el tratamiento de cáncer.

(6) Una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en (1) para uso en combinación con un compuesto de sulfonamida como se define en (1) en el tratamiento de cáncer.

(7) Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de sulfonamida como se define en (1) para uso en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en

(1) en el tratamiento de cáncer.

(8) Una composición farmacéutica que comprende una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 para uso en combinación con un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.

5 Los compuestos de sulfonamida según (1)-(8) anteriores incluyen al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

10 N-(3-cloro- H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida,
N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida,

o una sal farmacológicamente aceptable de las mismas, o un solvato de las mismas.

15 En (1)-(8) anteriores, la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF puede ser un inhibidor de la cinasa del receptor de EGF o un anticuerpo anti-EGFR.

El inhibidor de la cinasa del receptor de EGF es al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

20 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-(3-(4-morfolino)propoxi-quinazolina),
4-(3-etinilfenilamino)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-quinazolina;

o una sal farmacológicamente aceptable de las mismas o un solvato de las mismas.

25 El anticuerpo anti-EGFR es cetuximab.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral.

30 Más específicamente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral combinando un compuesto de sulfonamida, es decir, al menos un compuesto seleccionado de E7070 o E7820, con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF, seleccionándose al menos uno de gefitinib, erlotinib y cetuximab. Por tanto, la composición farmacéutica y el kit de la invención pueden usarse para el tratamiento de cáncer.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una vista teórica del método de Isobologram.

La Figura 2 muestra el efecto del uso combinado de E7820 y gefitinib en un ensayo de proliferación celular según el método de Isobologram.

40 La Figura 3 muestra el efecto del uso combinado de E7070 y gefitinib en un ensayo de proliferación celular según el método de Isobologram.

La Figura 4 muestra el efecto obtenido mediante el uso combinado de E7070 y erlotinib en un ensayo de proliferación celular según el método de Isobologram.

45 La Figura 5 muestra el efecto obtenido mediante el uso combinado de E7820 y gefitinib en un modelo de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (PC9). En la figura, * indica un efecto sinérgico estadísticamente significativo a un nivel de significancia inferior a 0,01. En la figura, N° de días indica los días desde el primer día de administración (día 1).

50 La Figura 6 muestra el efecto obtenido mediante el uso combinado de E7820 y gefitinib en un modelo de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549). En la figura, * indica un efecto sinérgico estadísticamente significativo a un nivel de significancia inferior a 0,01. En la figura, N° de días indica los días desde el primer día de administración (día 1).

55 La Figura 7 muestra el efecto obtenido mediante el uso combinado de E7820 y erlotinib en un modelo de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549). En la figura, * indica un efecto sinérgico estadísticamente significativo a un nivel de significancia inferior a 0,01. En la figura, N° de días indica los días desde el primer día de administración (día 1).

La Figura 8 muestra los resultados del análisis jerárquico de clúster en las micromatrices de ADN en el Ejemplo 7.

La Figura 9 muestra coeficientes de correlación en las micromatrices de ADN en el Ejemplo 8.

60 La Figura 10 muestra los resultados del análisis jerárquico de clúster en las micromatrices de ADN en el Ejemplo 8.

La Figura 11 muestra coeficientes de correlación en las micromatrices de ADN en el Ejemplo 8.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis jerárquico de clúster en las micromatrices de ADN en el Ejemplo 8.

65 La Figura 13 muestra efectos antiproliferativos de E7070, E7820, CQS, LY186641, LY295501 y LY-ASAP sobre HCT116-C9, HCT116-C9-C1 y HCT116-C9-C4 como se mide por el ensayo de medición del crecimiento celular.

La Figura 14 muestra efectos antiproliferativos de E7070 y LY573636 sobre HCT116-C9, HCT116-C9-C1 y HCT116-C9-C4 como se mide por el ensayo de medición del crecimiento celular.

MEJORES MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

5 En lo sucesivo se describirán realizaciones de la presente invención. Las siguientes realizaciones se describen para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar la presente invención. La presente invención puede llevarse a cabo en diversas realizaciones siempre y cuando no se aparten del alcance de la invención.

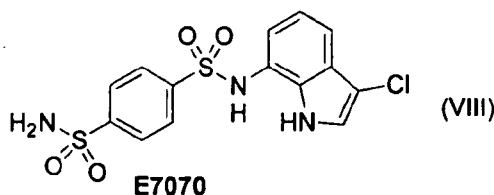
10 Las publicaciones, publicaciones de patente abiertas a consulta por el público, publicaciones de patente y otros documentos de patente citados en este documento se incorporan en este documento por referencia.

1. Compuesto de sulfonamida

15 Una composición farmacéutica y/o un kit de la presente invención comprenden un compuesto de sulfonamida. Según la presente invención, el compuesto de sulfonamida comprende N-(3-cloro-1H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida, N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato de las mismas.

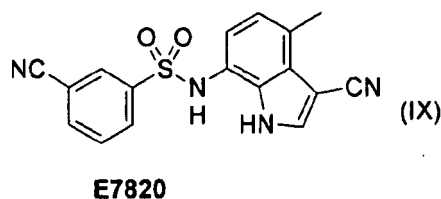
20 El compuesto de sulfonamida es E7070 o E7820.

E7070 es N-(3-cloro-1H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida, cuya fórmula estructural se representa por la siguiente fórmula (VIII).



25 E7070 puede producirse según un procedimiento conocido, por ejemplo, por aquellos descritos en la publicación internacional nº 95/07276 (folleto) (WO95/07276) y/o el Ejemplo 19 de la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 7-165708 (JP7-165708).

30 E7820 es N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida, cuya fórmula estructural se representa por la siguiente fórmula (IX).



35 E7820 puede producirse según un procedimiento conocido, por ejemplo, mediante un procedimiento descrito en la publicación internacional nº 00/50395 (folleto) (WO00/50395).

40 El compuesto de sulfonamida puede formar una sal farmacológicamente aceptable con ácido o base. El compuesto de sulfonamida de la invención también comprende estas sales farmacológicamente aceptables. Ejemplos de sales formadas con ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como sales de clorhidrato, sales de bromhidrato, sales de sulfato y sales de fosfato, y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido trifluoroacético. Ejemplos de sales formadas con bases incluyen sales de metales alcalinos tales como sal de sodio y sal de potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio y sal de magnesio, sales con bases orgánicas tales como trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, dicitlohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, arginina y lisina (sales de aminas orgánicas) y sales de amonio.

50 Además, el compuesto de sulfonamida puede estar en forma de anhídrido y puede formar un solvato tal como un hidrato. El solvato puede ser tanto un hidrato como un no hidrato, preferentemente un hidrato. El disolvente usado

puede ser agua, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o n-propanol), dimetilformamida o similares.

Si existen los solvatos y/o enantiómeros de estos compuestos, el compuesto de sulfonamida de la invención comprende estos solvatos y/o enantiómeros. El compuesto de sulfonamida de la invención también comprende un compuesto de sulfonamida que se somete a metabolismo tal como oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación *in vivo*. Además, el compuesto de sulfonamida de la invención también comprende compuestos que generan un compuesto de sulfonamida que se somete a metabolismo tal como oxidación, reducción e hidrólisis *in vivo*.

2. Sustancia que tiene actividad inhibitoria de EGF

Una composición farmacéutica y/o un kit de la invención comprenden una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. Según la presente invención, la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF inhibe la acción, actividad de EGF o similares, y puede ser un inhibidor de la cinasa del receptor de EGF (EGFR) o un anticuerpo anti-receptor de EGF (EGFR).

Actividad inhibitoria de EGF se refiere a actividad en la inhibición de actividad fisiológica y/o actividad farmacológica de EGF. La actividad inhibitoria de EGF puede determinarse mediante un procedimiento existente, por ejemplo, ensayo de proliferación celular, ensayo de cinasa o transferencia Western. Puede asumirse que la sustancia es una sustancia que tiene actividad inhibitoria de EGF cuando una actividad inhibitoria de EGF cuantificada por estos procedimientos es, por ejemplo, 30 μM o inferior, preferentemente 10 μM o inferior, más preferentemente 3 μM o inferior, todavía más preferentemente 1 μM o inferior, a la concentración inhibitoria al 50%.

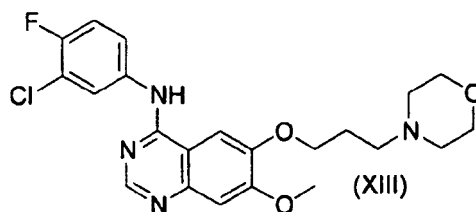
(1) Inhibidor de la cinasa de EGFR

Según la presente invención, un inhibidor de la cinasa de EGFR puede ser gefitinib o erlotinib.

El inhibidor de la cinasa de EGFR puede producirse mediante un procedimiento conocido, por ejemplo, aquellos que se describen en la publicación internacional nº 96/33980 (folleto) (WO96/33980), la patente japonesa nº 3040486 (JP3040486) y la patente de EE.UU. nº 5770599 (memoria descriptiva) (US5770599).

Un compuesto particularmente preferible es gefitinib.

El gefitinib es 4-(3-cloro-4-fluorofenilamino)-7-metoxi-6-(3-(4-morfolino)propoxi)-quinazolina, cuya fórmula estructural se representa por la siguiente fórmula (XIII).

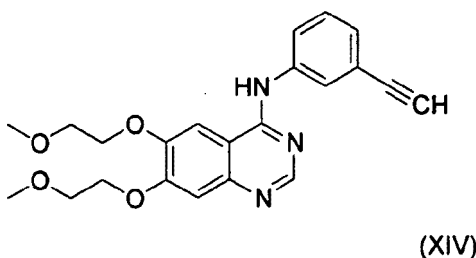


El gefitinib puede producirse según un procedimiento conocido, por ejemplo, por aquellos descritos en la publicación internacional nº 96/33980 (folleto) (WO96/33980), la patente japonesa nº 3040486 (JP3040486) y la patente de EE.UU. nº 5770599 (memoria descriptiva) (US5770599).

Por tanto, el gefitinib puede obtenerse comprando Iressa[®] de AstraZeneca.

Un compuesto particularmente preferible es erlotinib.

El erlotinib se refiere a 4-(3-etinilfenilamino)-6,7-bis(2-metoxietoxi)-quinazolina, cuya fórmula estructural se representa por la siguiente fórmula (XIV).



El erlotinib puede producirse según un procedimiento conocido, por ejemplo, por aquellos descritos en la publicación internacional nº 96/30347 (folleto) (WO96/30347), la patente japonesa nº 3088018 (JP3088018) y la patente japonesa nº 3420549 (JP3420549).

5 El erlotinib también puede obtenerse comprando Tarceva[®] de Genentech.

(2) Anticuerpo anti-EGFR

Según la presente invención, el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab.

10 El cetuximab puede obtenerse según procedimientos descritos en la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2002-114710 (JP2004-114710) y la publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público nº 2-291295 (JP2-291295).

15 Además, el cetuximab puede obtenerse comprando Erbitux[®] de Merck y Bristol-Myers Squibb.

(3) Sales, hidratos y solvatos

20 Una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF puede formar una sal farmacológicamente aceptable con ácido o base. Una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF de la invención también comprende estas sales farmacológicamente aceptables. Ejemplos de sales formadas con ácidos incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como sales de clorhidrato, sales de bromhidrato, sales de sulfato y sales de fosfato, y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido trifluoroacético. Ejemplos de sales formadas con bases incluyen sales de metales alcalinos tales como sal de sodio y sal de potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sal de calcio y sal de magnesio, y sales formadas con bases orgánicas tales como trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, dicitclohexilamina y N,N'-dibenciletildiamina, arginina, lisina (sales de aminas orgánicas) y sales de amonio.

30 Una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF puede ser un anhídrido o puede formar un solvato tal como un hidrato. El solvato puede ser tanto un hidrato como un no hidrato, preferentemente un hidrato. El disolvente puede usar agua, alcohol (por ejemplo, metanol, etanol o n-propanol), dimetilformamida o similares.

35 Si existen solvatos y/o enantiómeros de estas sustancias que tienen una actividad inhibitoria de EGF, también están comprendidos en la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF de la invención. La sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF de la invención también comprende sustancias que tienen una actividad inhibitoria de EGF que se someten a metabolismo *in vivo* tal como oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación. Además, la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF de la invención también comprende compuestos que generan sustancias que tienen una actividad inhibitoria de EGF que se someten a metabolismo *in vivo* tal como oxidación, reducción e hidrólisis.

3. Composición farmacéutica, kit y procedimiento para tratar cáncer

45 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, a un kit y a un kit o composición para tratar cáncer, caracterizados porque comprende un compuesto de sulfonamida en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF.

50 Según la presente invención, un compuesto de sulfonamida es como se describen en "1. Compuesto de sulfonamida". El compuesto de sulfonamida es al menos un compuesto seleccionado de: E7070 y E7820.

Según la presente invención, una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF es como se describe en "2. Sustancia que tiene actividad inhibitoria de EGF". La sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF es al menos un sustancia seleccionada de: (A) un inhibidor de la cinasa del receptor de EGF, que es gefitinib o erlotinib; y (B) un anticuerpo anti-EGFR que es cetuximab, es decir, la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF es al menos un sustancia seleccionada de gefitinib, erlotinib y cetuximab.

Según la presente invención, el compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF también comprenden sales farmacológicamente aceptables de la misma o solvatos tales como hidratos de la misma.

60 Según la presente invención, el compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF pueden usarse en cualquier combinación.

La composición farmacéutica de la invención comprende un compuesto de sulfonamida en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. La composición farmacéutica de la invención es útil para tratar cáncer.

Según la presente invención, el término “en combinación con” se refiere a una combinación de compuestos para uso combinado e incluye tanto modos en los que compuestos separados se administran en combinación como una mezcla.

5 La composición farmacéutica de la invención también se proporciona en otra realización de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de sulfonamida que se administra a un paciente en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. El compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF pueden administrarse tanto simultáneamente como por separado. El término “simultáneo” se refiere a administraciones al mismo tiempo en un programa de administración único. En este caso
10 no es necesario usar completamente la misma hora y minuto para administración. El término “por separado” se refiere a administraciones a diferentes tiempos en un programa de administración único.

El kit de la invención comprende un conjunto de una formulación que comprende un compuesto de sulfonamida y una formulación que comprende una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. Las formulaciones comprendidas en el kit de la invención no se limitan a una forma particular siempre y cuando comprendan un compuesto de sulfonamida o una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. El kit de la invención es útil para tratar cáncer.
15

En el kit de la invención, la formulación que comprende un compuesto de sulfonamida y la formulación que comprende una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF pueden mezclarse juntas o acomodarse por separado en un único envase. Pueden administrarse simultáneamente o una puede administrarse precediendo a la otra.
20

La composición farmacéutica y/o el kit de la invención pueden combinarse adicionalmente con uno o más fármacos anticancerígenos adicionales. Los fármacos anticancerígenos adicionales no están particularmente limitados con tal que sean formulaciones que tienen una actividad antitumoral. Ejemplos de los fármacos anticancerígenos adicionales incluyen clorhidrato de irinotecán (CPT-11), oxaliplatino, 5-fluorouracil (5-FU), docetaxel (Taxotere[®]), clorhidrato de gemcitabina (Gemzar[®]), folinato de calcio (leucovorina) y bevacizumab (Avastin[®]). Fármacos anticancerígenos adicionales particularmente preferibles son clorhidrato de irinotecán, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, folinato de calcio o bevacizumab cuando el tipo de cáncer que va a ser tratado por el fármaco es cáncer de colon, clorhidrato de gemcitabina o bevacizumab para cáncer de páncreas, bevacizumab para cáncer renal y docetaxel para cáncer de pulmón.
25
30

Más ejemplos de combinaciones particularmente preferibles de los compuestos según la invención se muestran en la Tablas 1, 2, 3 y 4 para los casos para tratar cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer renal y cáncer de pulmón por el fármaco terapéutico, respectivamente.
35

Tabla 1

Compuestos combinados						
1	E7070	Gefitinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	
2	E7820	Gefitinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	
3	E7070	Erlotinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	
4	E7820	Erlotinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	
5	E7070	Cetuximab	5-FU	LV	Oxaliplatino	
6	E7820	Cetuximab	5-FU	LV	Oxaliplatino	
7	E7070	Gefitinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	Bevacizumab
8	E7820	Gefitinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	Bevacizumab
9	E7070	Erlotinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	Bevacizumab
10	E7820	Erlotinib	5-FU	LV	Oxaliplatino	Bevacizumab
11	E7070	Cetuximab	5-FU	LV	Oxaliplatino	Bevacizumab
12	E7820	Cetuximab	5-FU	LV	Oxaliplatino	Bevacizumab
13	E7070	Gefitinib	5-FU	LV	CPT-11	
14	E7820	Gefitinib	5-FU	LV	CPT-11	
15	E7070	Erlotinib	5-FU	LV	CPT-11	
16	E7820	Erlotinib	5-FU	LV	CPT-11	
17	E7070	Cetuximab	5-FU	LV	CPT-11	

Compuestos combinados						
18	E7820	Cetuximab	5-FU	LV	CPT-11	
19	E7070	Gefitinib	5-FU	LV	CPT-11	Bevacizumab
20	E7820	Gefitinib	5-FU	LV	CPT-11	Bevacizumab
21	E7070	Erlotinib	5-FU	LV	CPT-11	Bevacizumab
22	E7820	Erlotinib	5-FU	LV	CPT-11	Bevacizumab
23	E7070	Cetuximab	5-FU	LV	CPT-11	Bevacizumab
24	E7820	Cetuximab	5-FU	LV	CPT-11	Bevacizumab
25	E7070	Gefitinib				Bevacizumab
26	E7820	Gefitinib				Bevacizumab
27	E7070	Erlotinib				Bevacizumab
28	E7820	Erlotinib				Bevacizumab
29	E7070	Cetuximab				Bevacizumab
30	E7820	Cetuximab				Bevacizumab

La Tabla 1 muestra combinaciones preferibles de la invención en las que el tipo de cáncer que va a ser tratado por el fármaco terapéutico para cáncer es cáncer de colon. En la tabla, LV representa folinato de calcio.

5

Tabla 2

Compuestos combinados				
1	E7070	Gefitinib	Gemcitabina	
2	E7820	Gefitinib	Gemcitabina	
3	E7070	Erlotinib	Gemcitabina	
4	E7820	Erlotinib	Gemcitabina	
5	E7070	Cetuximab	Gemcitabina	
6	E7820	Cetuximab	Gemcitabina	
7	E7070	Gefitinib	Gemcitabina	Bevacizumab
8	E7820	Gefitinib	Gemcitabina	Bevacizumab
9	E7070	Erlotinib	Gemcitabina	Bevacizumab
10	E7820	Erlotinib	Gemcitabina	Bevacizumab
11	E7070	Cetuximab	Gemcitabina	Bevacizumab
12	E7820	Cetuximab	Gemcitabina	Bevacizumab

La Tabla 2 muestra combinaciones preferibles de la invención en las que el tipo de cáncer que va a ser tratado por el fármaco terapéutico para cáncer es cáncer de páncreas. En la tabla, gemcitabina representa clorhidrato de gemcitabina.

10

Tabla 3

Compuestos combinados			
1	E7070	Gefitinib	Bevacizumab
2	E7820	Gefitinib	Bevacizumab
3	E7070	Erlotinib	Bevacizumab
4	E7820	Erlotinib	Bevacizumab
5	E7070	Cetuximab	Bevacizumab
6	E7820	Cetuximab	Bevacizumab

La Tabla 3 muestra combinaciones preferibles de la invención en las que el tipo de cáncer que va a ser tratado por el fármaco terapéutico para cáncer es cáncer renal.

Tabla 4

Compuestos combinados			
1	E7070	Gefitinib	Docetaxel
2	E7820	Gefitinib	Docetaxel
3	E7070	Erlotinib	Docetaxel
4	E7820	Erlotinib	Docetaxel
5	E7070	Cetuximab	Docetaxel
6	E7820	Cetuximab	Docetaxel

5 La Tabla 4 muestra combinaciones preferibles de la invención en las que el tipo de cáncer que va a ser tratado por el fármaco terapéutico para cáncer es cáncer de pulmón.

La composición farmacéutica y/o el kit de la invención pueden usarse como un fármaco terapéutico para cáncer.

10 Los tratamientos según la presente invención comprenden alivio sintomático de la enfermedad, retraso de la progresión de síntomas de la enfermedad, eliminación de los síntomas de la enfermedad, mejora del pronóstico de la enfermedad y prevención de la reaparición de la enfermedad.

15 Un fármaco terapéutico para cáncer según la invención comprende aquellos que contienen un agente antitumoral, un fármaco para mejorar el pronóstico del cáncer, un fármaco para prevenir la reaparición del cáncer, un fármaco antimetastásico o similares.

El efecto del tratamiento del cáncer puede confirmarse por observación de imágenes de rayos X, CT o similares, diagnóstico histopatológico por biopsia o valor de marcador tumoral.

20 La composición farmacéutica y/o el kit de la invención pueden administrarse a mamíferos (por ejemplo, ser humano, rata, conejo, oveja, cerdo, ganado, gato, perro y mono).

25 Ejemplos de los tipos de cánceres elegidos como diana por el fármaco terapéutico para cáncer incluyen, pero no se limitan a, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en tumor cerebral, cáncer de cuello de útero, cáncer esofágico, cáncer de lengua, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado y duodenal, cáncer de colon (cáncer de colon y cáncer rectal), cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la vesícula biliar, cáncer faríngeo, sarcoma (por ejemplo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Kaposi, miosarcoma, angiosarcoma, fibrosarcoma, etc.), leucemia (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia mielocítica aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LCC), leucemia linfocítica aguda (LCA), linfoma, mieloma múltiple (MM), etc.) y melanoma. Preferentemente, el tipo de cáncer elegido como diana por el fármaco terapéutico para cáncer es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer renal y cáncer de pulmón, más preferentemente cáncer de pulmón, y particularmente preferentemente cáncer de pulmón no microcítico.

35 La composición farmacéutica y/o el kit de la invención pueden administrarse por vía oral o parenteralmente.

40 Si se usa la composición farmacéutica y/o el kit de la invención, la dosis administrada del compuesto de sulfonamida es diferente dependiendo del grado del síntoma, edad, sexo, peso y diferencia de sensibilidad del paciente, modo de administración, periodo de administración, intervalo de administración y naturaleza, prescripción y tipo de la formulación farmacéutica y el tipo del principio activo. Normalmente, pero sin limitación, la dosis del compuesto de sulfonamida es 10-6000 mg/día, preferentemente 50-4000 mg/día, más preferentemente 50-2000 mg/día para un adulto (peso 60 Kg), que puede administrarse de una vez a tres veces al día.

45 Si se usa la composición farmacéutica y/o el kit de la invención, la dosis administrada de la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF es normalmente, pero no está particularmente limitada a, 10-6000 mg/día, preferentemente 50-4000 mg/día, más preferentemente 50-2000 mg/día para un adulto, que puede administrarse de una vez a tres veces al día.

50 Si se usa la composición farmacéutica y/o el kit de la invención, la dosis administrada del inhibidor de la cinasa de EGFR es normalmente, pero no está particularmente limitada a, 10-6000 mg/día, preferentemente 50-4000 mg/día, más preferentemente 50-2000 mg/día para un adulto, que puede administrarse de una vez a tres veces al día.

55 Si se usa la composición farmacéutica y/o el kit de la invención, la dosis administrada del anticuerpo anti-EGFR es normalmente, pero no está particularmente limitada a, 1-6000 mg/día, preferentemente 10-2000 mg/día, más

preferentemente 10-1000 mg/día para un adulto, que puede administrarse de una vez a tres veces al día.

La cantidad del compuesto de sulfonamida usado no está particularmente limitada y es diferente dependiendo de la combinación individual con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. Por ejemplo, la cantidad del compuesto de sulfonamida es aproximadamente 0,01-100 veces (relación de peso), más preferentemente aproximadamente 0,1-10 veces (relación de peso) de la cantidad de la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF.

La composición farmacéutica de la invención puede prepararse en diversas formas farmacéuticas, por ejemplo, en formulaciones orales sólidas o formulaciones parenterales tales como inyección, supositorio, pomada y parche dérmico.

Además, el compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF contenida en el kit de la invención pueden prepararse individualmente en diversas formas farmacéuticas, por ejemplo, en formulaciones orales sólidas o formulaciones parenterales tales como inyección, supositorio, pomada y parche dérmico.

Con el fin de preparar una formulación oral sólida, a un agente principal pueden añadirse un excipiente y, si fuera necesario, un aglutinante, disgregante, lubricante, colorante, un aromatizante o similares, y luego prepararse en un comprimido, un comprimido recubierto, gránulo, gránulo discreto, polvo, una cápsula o similares según un procedimiento convencional. Además, también puede prepararse apropiadamente una formulación oral no sólida tal como un agente de jarabe.

Por ejemplo, lactosa, almidón de maíz, sacarosa, glucosa, sorbitol, celulosa cristalina, dióxido de silicio o similares puede usarse como excipiente; por ejemplo, poli(alcohol vinílico), etilcelulosa, metilcelulosa, goma arábica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o similares pueden usarse como aglutinante; por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice o similares pueden usarse como lubricante; aquellos que están permitidos para ser añadidos a preparaciones farmacéuticas pueden usarse como colorante; y, por ejemplo, polvo de cacao, mentol, ácido aromático, esencia de menta, alcanfor, polvo de canela o similares pueden usarse como aromatizante. Por supuesto, si fuera necesario, estos comprimidos y gránulo pueden recubrirse apropiadamente con recubrimiento de azúcar, recubrimiento de gelatina o de otro modo.

Si va a prepararse una inyección, si fuera necesario, el agente principal puede añadirse con un ajustador de pH, un tampón, un agente de suspensión, un adyuvante de solubilización, un estabilizador, un agente de isotonización, un conservante o similares, y puede prepararse en una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular o una inyección por goteo intravenoso según un procedimiento convencional. En este caso, si fuera necesario, también se prepara una forma liofilizada por una técnica convencional.

Ejemplos del agente de suspensión pueden incluir metilcelulosa, Polysorbate 80, hidroxietilcelulosa, goma arábica, tragacanto en polvo, carboximetilcelulosa de sodio y monolaurato de polioxietilensorbitano.

Ejemplos del adyuvante de solubilización pueden incluir aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno, Polysorbate 80, amida del ácido nicotínico, monolaurato de polioxietilensorbitano, macrogol y éster etílico de ácido graso de aceite de ricino.

Ejemplos del estabilizador pueden incluir sulfito de sodio y metasulfito de sodio; ejemplos del conservante pueden incluir parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol.

Además del compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF, la composición farmacéutica y/o el kit de la invención también pueden comprender un recipiente de envasado, una instrucción, un prospecto o similares. El recipiente de envasado, la instrucción, el prospecto o similares pueden incluir descripción de las combinaciones para uso combinado del compuesto, y el uso y la dosificación en el caso de administrar sustancias separadas en combinación o en el caso de administrarlas en forma de una mezcla. El uso y la dosificación pueden describirse con referencia a la descripción relacionada anterior.

El kit de la invención también puede comprender: (a) al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un recipiente de envasado, una instrucción y un prospecto que describe el uso combinado del compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF; y (b) una composición farmacéutica que comprende el compuesto de sulfonamida. El kit es útil para tratar cáncer. La composición farmacéutica que comprende el compuesto de sulfonamida es útil para tratar cáncer. El recipiente de envasado, la instrucción, el prospecto o similares pueden incluir la descripción de combinaciones para uso combinado del compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF, y el uso y la dosificación para uso combinado en el caso de administrar sustancias separadas en combinación o en el caso de administrarlas en forma de una mezcla. El uso y la dosificación pueden describirse con referencia a la descripción relacionada anterior.

La presente invención también comprende el uso del compuesto de sulfonamida para producir una composición farmacéutica en combinación con la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF. Según el uso de la

invención, la composición farmacéutica es útil para tratar cáncer.

El compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF pueden usarse en un procedimiento para tratar cáncer que comprende administrar simultáneamente o por separado el compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF a un paciente. La vía y el procedimiento para administrar el compuesto de sulfonamida y la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF no están particularmente limitados, pero puede hacerse referencia a la descripción anterior de la composición farmacéutica de la invención.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá a modo de ejemplos específicos, aunque la presente invención no está limitada a éstos.

EJEMPLO 1: Uso combinado de E7820 y gefitinib en la proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (PC9) *in vitro*

Se suspendió la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano PC9 (obtenida de Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) a 1×10^4 células/ml, y cada 100 μ l de esta disolución se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos para el cultivo en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C. Seis horas después del inicio del cultivo el medio se eliminó. Entonces, una disolución que contenía E7820, una disolución que contenía gefitinib (Iressa® comprado de AstraZeneca) y una disolución que contenía ambos compuestos, es decir, E7820 y gefitinib, se diluyeron cada una en una disolución de cultivo (RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%)). Estas disoluciones diluidas se añadieron a las células anteriores para el cultivo adicional.

Tres días después se añadieron 10 μ l de la disolución Cell Counting Kit-8 (Cell Counting Kit-8, Wako Pure Chemical Industries), se cultivaron durante 6 horas a 37°C y absorbancia a 450 nm se determinó con un lector de placas (Corona Electric Co., Ltd.).

El efecto del uso combinado se evaluó por el método de Isobologram (Figura 1, Steel GG y col.: Int J Radiat Oncol Biol Phys 5: 85-91, 1979., Kano Y, y col.: Int J Cancer 50: 604-610, 1992.). Según este procedimiento se calcularon tres tipos de curvas (modo I, modo IIa y modo IIb) a partir de la curva de las cifras de células en crecimiento con respecto a la concentración de cada compuesto, mostrando las concentraciones teóricas para inhibir el 50% del crecimiento celular usando la combinación. Por tanto, si una representación de la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) en un pocillo en el que se usan los compuestos en combinación está dentro de la región rodeada por estas tres líneas (región aditiva) (Figura 1, "Pb"), se considera que tiene un efecto aditivo. Si una representación de la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) en un pocillo en el que se usan los compuestos en combinación está dentro de una región interna de las curvas de modo (Figura 1, "Pa"), se considera que tiene un efecto sinérgico. Si una representación de la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) en un pocillo en el que se usan los compuestos en combinación está dentro de una región fuera de las curvas de modo (Figura 1, "Pc"), se considera que tiene un efecto antagonista. Si una representación de la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) en un pocillo en el que se usan los compuestos en combinación supera la CI₅₀ de cada compuesto, se considera que tiene un efecto de protección (Figura 1, "Pd").

Como resultado se encontró que E7820 tenía un efecto sinérgico tras el uso combinado con gefitinib (Figura 2, "Combi.").

EJEMPLO 2: Uso combinado de E7070 y gefitinib en la proliferación *in vitro* de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (PC9)

Se suspendió la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano PC9 en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) a 1×10^4 células/ml, y cada 100 μ l de esta disolución se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos para el cultivo en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C. Veinticuatro horas después del inicio del cultivo el medio se eliminó. Una disolución que contenía E7070, una disolución que contenía gefitinib (comprado de AstraZeneca) y una disolución que contenía ambos compuestos, es decir, E7070 y gefitinib, se diluyeron cada una en una disolución de cultivo (RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%)). Entonces, estas disoluciones diluidas se añadieron a las células anteriores para el cultivo adicional.

Tres días después, las células se lavaron con 100 μ l de PBS/pocillo y se inmovilizaron con ácido tricloroacético al 10%. Entonces, las células se tiñeron por la técnica de SRB para determinar la absorbancia a 550 nm con un lector de placas.

El efecto del uso combinado se evaluó por el método de Isobologram.

Como resultado se encontró E7070 que tenía un efecto sinérgico tras el uso combinado con gefitinib (Figura 3, "Combi.").

EJEMPLO 3: Uso combinado de E7070 y erlotinib en la proliferación *in vitro* de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (PC9)

Se suspendió la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano PC9 en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) a 1×10^4 células/ml, y cada 100 μ l de esta disolución se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos para el cultivo en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C. Veinticuatro horas después del inicio del cultivo el medio se eliminó. Una disolución que contenía E7070, una disolución que contenía erlotinib (Tarceva® comprado de Genentech) y una disolución que contenía ambos compuestos, es decir, E7070 y erlotinib, se diluyeron cada una en una disolución de cultivo (RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%)). Entonces, estas disoluciones diluidas se añadieron a las células anteriores para el cultivo adicional.

Tres días después, las células se lavaron con 100 μ l de PBS/pocillo y se inmovilizaron con ácido tricloroacético al 10%. Entonces, las células se tiñeron por la técnica de SRB para determinar la absorbancia a 550 nm con un lector de placas.

El efecto de uso combinado se evaluó por el método de Isobologram.

Como resultado se encontró que E7070 tenía un efecto sinérgico tras el uso combinado con erlotinib (Figura 4, "Combi.").

EJEMPLO 4: Uso combinado de E7820 y gefitinib en el modelo de trasplante subcutáneo (*in vivo*) de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (PC9)

Se cultivó la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano PC9 (obtenida de Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C a aproximadamente el 80% de confluencia, y las células se recogieron con tripsina-EDTA. Usando un tampón fosfato se prepararon 5×10^7 células/ml de suspensión, y cada 0,1 ml de la suspensión de células resultante se trasplantó subcutáneamente a un ratón sin pelo en la ijada de su cuerpo. Ocho días después del trasplante, E7820 y gefitinib se administraron por vía oral solos o en combinación a 50 mg/kg dos veces al día durante 2 semanas y a 75 mg/kg una vez al día durante 2 semanas, respectivamente. Se midieron los ejes principal y secundario de los tumores con el compás calibrador Digimatic (Mitsutoyo), y los volúmenes del tumor y los volúmenes relativos del tumor se calcularon según las siguientes fórmulas.

$$\text{Volumen del tumor VT} = \text{Eje principal del tumor (mm)} \times (\text{eje secundario del tumor})^2 (\text{mm}^2)/2$$

$$\text{Volumen relativo del tumor VRT} = \text{Volumen del tumor en el día de medida} / \text{volumen del tumor en el primer día de administración}$$

Si se observó interacción estadísticamente significativa en el grupo de uso combinado por ANOVA bidireccional se consideró que existía un efecto sinérgico entre E7820 y gefitinib.

Como resultado se encontró que E7820 produjo un efecto sinérgico cuando se usó en combinación con gefitinib, y su uso combinado mostró un efecto antitumoral superior en comparación con el efecto obtenido con E7820 o gefitinib solos (Tabla 5 y Figura 5). Además, el uso combinado de E7820 y gefitinib también mostró un sorprendente efecto antitumoral que no puede observarse con gefitinib solo (Tabla 5 y Figura 5).

Tabla 5

Compuesto administrado	Volumen relativo del tumor en el día 15 Promedio \pm desviación estándar	ANOVA bidireccional
Control (sin tratar)	4,12 \pm 0,68	
E7820 50 mg/kg	2,57 \pm 0,41	
Gefitinib 75 mg/kg	0,36 \pm 0,12	
E7820 50 mg/kg + gefitinib 75 mg/kg	12 \pm 0,03	p < 0,01 Efecto sinérgico

La Tabla 5 muestra efectos antitumorales obtenidos mediante el uso de E7820 solo, el uso de gefitinib solo y el uso combinado de E7820 y gefitinib en modelos de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (PC9). El primer día de administración se consideró el día 1.

De los resultados obtenidos, la combinación de E7820 y gefitinib proporciona una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral, y un procedimiento para tratar cáncer, y, por tanto, la composición farmacéutica, el kit y el procedimiento de la invención pueden usarse para tratar cáncer.

EJEMPLO 5: Uso combinado de E7820 y gefitinib en el modelo de trasplante subcutáneo (*in vivo*) de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

5 Se cultivó la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 (comprada de Dainippon Pharmaceutical) en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C a aproximadamente el 80% de confluencia, y las células se recogieron con tripsina-EDTA. Usando un tampón fosfato que contenía Matrigel al 50% se prepararon 5×10^7 células/ml de suspensión y cada 0,1 ml de la suspensión de células resultante se trasplantó subcutáneamente a un ratón sin pelo en la ijada de su cuerpo. Diez días después del trasplante, E7820 y gefitinib se administraron por vía oral solos o en combinación a 50 mg/kg dos veces al día durante 3 semanas y a 75 mg/kg una vez al día durante 3 semanas, respectivamente. Se midieron los ejes principal y secundario de los tumores con el compás calibrador Digimatic (Mitsutoyo) y los volúmenes del tumor y los volúmenes relativos del tumor se calcularon según las siguientes fórmulas.

$$15 \quad \text{Volumen del tumor VT} = \text{Eje principal del tumor (mm)} \times (\text{eje secundario del tumor})^2 (\text{mm}^2)/2$$

Volumen relativo del tumor VRT = Volumen del tumor en el día de medida / volumen del tumor en el primer día de administración

20 Si se observó interacción estadísticamente significativa en el grupo de uso combinado por ANOVA bidireccional se consideró que existía un efecto sinérgico entre E7820 y gefitinib.

25 Como resultado se encontró que E7820 produjo un efecto sinérgico cuando se usó en combinación con gefitinib, y su uso combinado mostró un efecto antitumoral superior en comparación con el efecto obtenido con E7820 o gefitinib solos (Tabla 6 y Figura 6). Además, el uso combinado de E7820 y gefitinib también mostró un sorprendente efecto antitumoral que no puede observarse con gefitinib solo (Tabla 6 y Figura 6).

Tabla 6

Compuesto administrado	Volumen relativo del tumor en el día 22 Promedio \pm desviación estándar	ANOVA bidireccional
Control (sin tratar)	4,95 \pm 0,86	
E7820 50 mg/kg	3,69 \pm 0,68	
Gefitinib 75 mg/kg	2,26 \pm 0,59	
E7820 50 mg/kg + gefitinib 75 mg/kg	1,05 \pm 0,21	p < 0,01 Efecto sinérgico

30 La Tabla 6 muestra efectos antitumorales obtenidos mediante el uso de E7820 solo, el uso de gefitinib solo y el uso combinado de E7820 y gefitinib en modelos de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549). El primer día de administración se consideró el día 1.

35 De los resultados obtenidos, la combinación de E7820 y gefitinib proporciona una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral, y un procedimiento para tratar cáncer, y, por tanto, la composición farmacéutica, el kit y el procedimiento de la invención pueden usarse para tratar cáncer.

EJEMPLO 6: Uso combinado de E7820 y erlotinib en el modelo de trasplante subcutáneo (*in vivo*) de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549)

40 Se cultivó la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 (comprada de Dainippon Pharmaceutical) en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C a aproximadamente el 80% de confluencia, y las células se recogieron con tripsina-EDTA. Usando un tampón fosfato que contenía Matrigel al 50% se prepararon 5×10^7 células/ml de suspensión y cada 0,1 ml de la suspensión de células resultante se trasplantó subcutáneamente a un ratón sin pelo en la ijada de su cuerpo. Diecisiete días después del trasplante, E7820 y erlotinib se administraron por vía oral solos o en combinación a 50 mg/kg dos veces al día durante 2 semanas y a 100 mg/kg una vez al día durante 2 semanas, respectivamente. Se midieron los ejes principal y secundario de los tumores con el compás calibrador Digimatic (Mitsutoyo) y los volúmenes del tumor y los volúmenes relativos del tumor se calcularon según las siguientes fórmulas.

$$50 \quad \text{Volumen del tumor VT} = \text{Eje principal del tumor (mm)} \times (\text{eje secundario del tumor})^2 (\text{mm}^2)/2$$

Volumen relativo del tumor VRT = Volumen del tumor en el día de medida / volumen del tumor en el primer día de administración

55 Si se observó interacción estadísticamente significativa en el grupo de uso combinado por ANOVA bidireccional se consideró que existía un efecto sinérgico entre E7820 y erlotinib.

Como resultado se encontró que E7820 produjo un efecto sinérgico cuando se usó en combinación con erlotinib y su uso combinado mostró un efecto antitumoral superior en comparación con el efecto obtenido con E7820 o erlotinib solos (Tabla 7 y Figura 7). Además, el uso combinado de E7820 y erlotinib también mostró un sorprendente efecto antitumoral que no puede observarse con erlotinib solo (Tabla 7 y Figura 7).

5

Tabla 7

Compuesto administrado	Volumen relativo del tumor en el día 15 Promedio \pm desviación estándar	ANOVA bidireccional
Control (sin tratar)	3,48 \pm 0,61	
E7820 50 mg/kg	2,62 \pm 0,07	
Erlotinib 100 mg/kg	1,94 \pm 0,19	
E7820 50 mg/kg + erlotinib 100 mg/kg	0,91 \pm 0,09	P < 0,01 Efecto sinérgico

La Tabla 7 muestra efectos antitumorales obtenidos mediante el uso de E7820 solo, el uso de erlotinib solo y el uso combinado de E7820 y erlotinib en modelos de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico humano (A549). El primer día de administración se consideró el día 1.

10

De los resultados obtenidos, la combinación de E7820 y erlotinib proporciona una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral, y un procedimiento para tratar cáncer, y, por tanto, la composición farmacéutica, el kit y el procedimiento de la invención pueden usarse para tratar cáncer.

15

EJEMPLO 7: Análisis de micromatrices de ADN

(1) Cultivo celular, tratamiento del compuesto y extracción de ARN

20

Con el fin de examinar cambios en la expresión génica inducida por los compuestos por un análisis de micromatrices de ADN se cultivaron la línea celular derivada de cáncer de colon humano HCT116 (Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA, EE.UU.) y la línea celular derivada de leucemia humana MOLT-4 (Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA, EE.UU.) en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. El posterior cultivo y el tratamiento del compuesto tuvieron lugar en una estufa de incubación fijada a 5% de CO₂ y 37°C. Las células HCT116 y las células MOLT-4 se sembraron en placas de cultivo celular de 10 cm de diámetro a 2,0 x 10⁶ células/placa, se cultivaron durante 24 horas y se sometieron a los siguientes tratamientos del compuesto.

25

Para las células HCT116 se evaluaron 12 compuestos, es decir, E7820 (0,8 μ M), E7070 (0,8 μ M), LY295501 (30 μ M), CQS (8 μ M), adriamicina (0,2 μ M), daunomicina (0,2 μ M), ICRF154 (80 μ M), ICRF159 (80 μ M), kenpaulona (10 μ M), alsterpaulona (10 μ M), tricostatina A (0,1 μ M) y rapamicina (80 μ M). Por otra parte, para las células MOLT-4 se evaluó E7070 (0,8 μ M). En este documento, adriamicina y daunomicina son compuestos conocidos como inhibidores de la ADN-topoisomerasa II intercalantes del ADN, ICRF154 y ICRF 159 son compuestos conocidos como inhibidores catalíticos de la ADN-topoisomerasa II, kenpaulona y alsterpaulona son compuestos conocidos como inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina (CDK), tricostatina A es un compuesto conocidos como un inhibidor de la histona-desacetilasa y rapamicina es un compuesto conocido como un inhibidor de mTOR/FRAP. La concentración de cada compuesto usado para el tratamiento se fijó a tres a cinco veces la concentración inhibitoria del crecimiento al 50% de cada compuesto para las células HCT116 (basado en tres días de actividad antiproliferativa usando WST-8). Las células se recogieron 24 horas después del tratamiento a la concentración indicada en el paréntesis que sigue al nombre de cada compuesto anterior. Similarmente también se recogieron células cultivadas durante 24 horas sin la adición de ningún compuesto.

40

La extracción del ARN total de las células recogidas se realizó usando el reactivo TRIZOL (Invitrogen) según la instrucción adjunta.

45

(2) Análisis de expresión génica usando una micromatriz de ADN

El ARN resultante se disolvió en 100 μ l de agua esterilizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), se purificó usando una columna RNeasy (QIAGEN) y se sintetizó ADNc bicatenario usando el sistema de elección SuperScript (Invitrogen) y cebadores T7-d(T)₂₄.

50

Primero, a 10 μ g de ARN se añadieron cebador T7-d(T)₂₄ 5 μ M, 1x tampón de la primera cadena, DTT 10 mM, mezcla de dNTP 500 μ M y 20 unidades/ μ l de la transcriptasa inversa SuperScript II y se hicieron reaccionar a 42°C durante una hora para sintetizar ADN monocatenario. Posteriormente se añadieron 1 x tampón de la segunda cadena, mezcla de dNTP 200 μ M, 67 U/ml de ADN ligasa, 270 U/ml de ADN polimerasa I y 13 U/ml de RNasa H y se hicieron reaccionar a 16°C durante dos horas para sintetizar ADNc bicatenario. Además, se añadieron 67 U/ml de T4

55

ADN polimerasa I, se hicieron reaccionar a 16°C durante 5 minutos y luego se añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para terminar la reacción.

5 El ADNc obtenido se purificó con fenol/cloroformo y se sometió a reacción de marcado con UTP y CTP biotinilados usando el kit RNA Transcript Labelling (Enzo Diagnostics) según la instrucción adjunta. El producto de reacción se purificó usando una columna RNeasy, se calentó en Tris-ácido acético 200 mM (pH 8,1), acetato de magnesio 150 mM y acetato de potasio 50 mM a 94°C durante 35 minutos para la fragmentación del ARNc.

10 El ARNc fragmentado se hibridó con la matriz Human Focus de GeneChip (Affymetrix) en MES 100 mM, sal de sodio 1 M, EDTA 20 mM y Tween 20 al 0,01% a 45°C durante 16 horas. Después de la hibridación, GeneChip se lavó y se tiñó según el protocolo Midi_euk2 adjunto a la estación de fluidos Affymetrix. Para la tinción se usaron estreptavidina-ficoeritrina y anticuerpo de cabra anti-estreptavidina biotinilado. El GeneChip teñido se escaneó usando un microscopio confocal HP con láser de ión argón (Hewlett Packard) para determinar la intensidad de fluorescencia. La medición tuvo lugar a longitudes de onda de excitación y de emisión de 488 nm y 570 nm, respectivamente.

20 Todos los análisis de datos cuantitativos se llevaron a cabo usando el software GeneChip (Affymetrix) y Gene Spring (SiliconGenetics). El software GeneChip se usó para evaluar cambios en la expresión génica inducida por cada compuesto, juzgándose que la expresión génica era significativamente “elevada” o “disminuida” cuando los valores cuantificados en las dos condiciones, es decir, entre el grupo tratado con compuesto y el grupo sin tratar, fueron diferentes dos veces o más. Gene Spring se usó para evaluar la similitud de cambios en la expresión génica inducida por cada compuesto, realizándose el análisis jerárquico de clúster basándose en los cambios en las expresiones de todos los genes en la matriz Human Focus.

25 Los resultados del análisis jerárquico de clúster para las células HCT116 se muestran en la Figura 8.

30 Como resultado del análisis, adriamicina y daunomicina, ICRF154 e ICRF159, y kenpaulona y alsterpaulona, teniendo cada par el mismo mecanismo de acción, dieron alteraciones genéticas similares (Figura 8). Por tanto, se confirmó que compuestos que tienen el mismo mecanismo de acción dan alteraciones genéticas similares.

E7070, E7820, LY295501 y CQS dieron alteraciones genéticas similares (Figura 8). Por tanto, se consideró que E7070, E7820, LY295501 y CQS tenían mecanismos de acción iguales o similares según este análisis, sugiriendo claramente que dan las mismas alteraciones y efectos genéticos o similares.

35 EJEMPLO 8: Análisis de micromatrices de ADN

40 Se cultivaron células HCT116 en un medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El siguiente cultivo y tratamiento del compuesto se llevó a cabo en una estufa de incubación al 5% de CO₂ y 37°C. Las células HCT116 se sembraron en placas de cultivo celular de 10 cm de diámetro a 2,0 x 10⁶ células/placa, se cultivaron durante 24 horas y se sometieron al siguiente tratamiento del compuesto.

45 En este ejemplo se examinaron cambios en la expresión génica de células HCT116 tras tratamientos con 12 compuestos, es decir, E7820 (0,16 µM), E7070 (0,26 µM), LY186641 (59 µM), LY295501 (24 µM), LY-573636 (9,6 µM), CQS (4,0 µM), MST16 (100 µM), etopósido (3,6 µM), etoxzolamida (410 µM), capsaicina (280 µM), tricostatina A (0,16 µM) y kenpaulona (7,1 µM).

50 MST16 es un compuesto conocido como inhibidor catalítico de la ADN-topoisomerasa II, etopósido es un compuesto conocido como un inhibidor de la ADN-topoisomerasa II que induce formación de un complejo escindible, etoxzolamida es un compuesto conocido como un inhibidor de la anhidrasa carbónica, capsaicina es un compuesto conocido como un inhibidor de la NADH-oxidasas de la membrana plasmática específica para tumor, tricostatina A es un compuesto conocido como un inhibidor de la histona-desacetilasa y kenpaulona es un compuesto conocido como un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina (CDK).

55 La concentración de cada compuesto usado para el tratamiento se fijó a dos veces la concentración inhibitoria al 50% de cada compuesto para las células HCT116 (basado en tres días de actividad antiproliferativa usando MTT). Las células se recogieron 24 horas después del tratamiento a la concentración indicada en el paréntesis que sigue al nombre de cada compuesto anterior. Similarmente también se recogieron células cultivadas durante 24 horas sin la adición de ningún compuesto.

60 La extracción del ARN total de las células recogidas se realizó usando el reactivo TRIZOL (Invitrogen) según la instrucción adjunta.

65 El análisis de expresión génica usando una micromatriz de ADN se llevó a cabo del mismo modo que “(2) Análisis de expresión génica usando una micromatriz de ADN” en el Ejemplo 7.

Este ejemplo se realizó para cada muestra por duplicado (para la comodidad del experimento, a las muestras se les dieron números de rama como control-1, control-2, E7070-1, E7070-2, etc., para distinguirlas). Entonces se usó el sistema GeneChip (Affymetrix) (matriz Human Focus) para analizar cambios en la expresión génica inducida por cada compuesto.

Los veintiséis archivos “.cel” obtenidos en este ejemplo (13 muestras (un control + 12 compuestos) x 2) se sometieron al método de RMA (método consistente de promedio de multimatrices (Biostatistics (2003), 4, 249-264)) para la distribución normal al nivel de muestra y luego se calculó el valor logarítmico de la intensidad de señal al nivel génico. A continuación, el valor logarítmico de la intensidad de señal del grupo sin tratar (control-1) se restó del valor logarítmico de la intensidad de señal del grupo tratado con compuesto para cada gen para obtener el valor logarítmico de la relación de señal del grupo tratado con compuesto con respecto al control-1. Entonces se calcularon coeficientes de correlación de coseno como coeficientes de correlación entre los experimentos (Figura 9). Basándose en estos coeficientes de correlación se realizó el análisis jerárquico de clúster según el método de UPGMA (método de grupos apareados sin ponderar con el método de la media aritmética) (Figura 10). El control-2 también se sometió a cálculo similar (Figuras 11 y 12). Los softwares usados fueron R 2.0.1 (<http://www.r-project.org/>) y el paquete Affy 1.5.8 (<http://www.bioconductor.org>).

En las Figuras 9-12, “LY1” representa LY186641, “LY2” representa LY295501, “LY5” representa LY573636, “CAI” representa etoxzolamida, “Cap” representa capsaicina, “MST” representa MST16, “Etop” representa etopósido, “TSA” representa tricostatina A y “Kenp” representa kenpaulona. En las Figuras 10 y 12, “de hclust (*, “promedio)” es un comando de análisis estadístico que muestra que el análisis de clúster se realiza por R usando el valor promedio de los datos experimentales por duplicado.

Como resultado del análisis, E7070, E7820, LY186641, LY295501, LY573636 y CQS mostraron alteraciones genéticas muy similares para las células HCT116, y se encontró que eran diferentes de los perfiles de cualquiera de los otros compuestos (MST16, etopósido, etoxzolamida, capsaicina, tricostatina A y kenpaulona) (Figuras 9-12). Por tanto, por este análisis se consideró que E7070, E7820, LY186641, LY295501, LY573636 y CQS tenían los mismos mecanismos de acción o similares, sugiriendo claramente que dan las mismas alteraciones y efectos genéticos o similares.

EJEMPLO 9: Experimento en paneles de líneas celulares de cáncer

Se usaron paneles de células de cáncer humano de 36 líneas celulares para examinar la correlación de actividades antiproliferativas entre E7820, E7070, CQS, LY186641 y LY295501.

Los 36 tipos de líneas celulares de cáncer usadas fueron DLD-1, HCT15, HCT116, HT29, SW480, SW620 y WiDr (que son líneas celulares de cáncer de colon humano), A427, A549, LX-1, NCI-H460, NCI-H522, PC-9 y PC-10 (que son líneas celulares de cáncer de pulmón humano), GT3TKB, HGC27, MKN1, MKN7, MKN28 y MKN74 (que son líneas celulares de cáncer gástrico humano), AsPC-1, KP-1, KP-4, MiaPaCall, PANC-1 y SUIT-2 (que son líneas celulares de cáncer de páncreas humano), BSY-1, HBC5, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MDA-MB-468 (que son líneas celulares de cáncer de mama humano) y CCRF-CEM, HL60, K562 y MOLT-4 (que son líneas celulares de leucemia humana). Todas las células se cultivaron usando medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en las condiciones de 5% de CO₂ y 37°C (Tabla 8).

Tabla 8

36 líneas celulares de cáncer humano probadas en ensayos de MTT de 3 días

Colon	Estómago	Mama
DLD-1 (1250/pocillo, 16,8 h)	GT3TKB (2000/pocillo, 21,1 h)	BSY-1 (2000/pocillo, 46,1 h)
HCT15 (1500/pocillo, 14,5 h)	HGC27 (1500/pocillo, 14,6 h)	HBC5 (2000/pocillo, 31,8 h)
HCT116 (1250/pocillo, 13,4 h)	MKN1 (4000/pocillo, 35,9 h)	MCF-7 (3000/pocillo, 29,5 h)
HT29 (2500/pocillo, 19,8 h)	MKN7 (3000/pocillo, 37,4 h)	MDA-MB231 (2000/pocillo, 21,6 h)
SW480 (3000/pocillo, 19,5 h)	MKN28 (2000/pocillo, 22,7 h)	MDA-MB-435 (3000/pocillo, 24,4 h)
SW620 (2500/pocillo, 17,3 h)	MKN74 (4000/pocillo, 24,8 h)	MDA-MB-468 (3000/pocillo, 34,2 h)
WiDr (2000/pocillo, 18,9 h)		
Pulmón	Páncreas	Leucemia
A427 (2500/pocillo, 32,4 h)	AsPC-1 (2500/pocillo, 28,4 h)	CCRF-CEM (1500/pocillo, 27,2 h)
A549 (1250/pocillo, 18,9 h)	KP-1 (2000/pocillo, 24,8 h)	HL60 (1500/pocillo, 29,5 h)
LX-1 (2000/pocillo, 17,2 h)	KP-4 (2000/pocillo, 16,7 h)	K562 (1500/pocillo, 20,6 h)

NCI-H460 (1000/pocillo, 13,6 h) MiaPaCall (2500/pocillo, 19,1 h) MOLT-4 (1500/pocillo, 22,3 h)
 NCI-H522 (4000/pocillo, 80,4 h) PANC-1 (2500/pocillo, 27,9 h)
 PC-9 (2000/pocillo, 23,7 h) SUIT-2 (2000/pocillo, 15,6 h)
 PC-10 (2000/pocillo, 24,0 h)

Línea celular (número inicial de células, tiempo de duplicación)

5 La Tabla 8 muestra los tipos, números de células sembradas y tiempos de duplicación de las líneas celulares de cáncer humano en paneles de líneas celulares de cáncer humano.

Las células se sembraron en una microplaca de 96 pocillos (fondo plano) al número indicado en la Tabla 8 (50 µl/pocillo). Veinticuatro horas después se añadieron con una serie de dilución triple de cada compuesto (50 µl/pocillo). Setenta y dos horas después se añadió WST-8 (10 µl/pocillo) y se determinó la absorbancia a 450 nm.
 10 Las concentraciones inhibitorias del crecimiento al 50% para las 36 líneas celulares de cáncer se obtuvieron por un procedimiento de mínimos cuadrados y sus patrones se compararon entre los compuestos. Como índice de correlación se usaron coeficientes de correlación de Pearson (Paull, K. D. y col. Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. J. Natl. Cancer Inst. 1989, 81, 1088-1092; Monks, A. y col. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 1991, 83, 757-766).
 15

Como resultado, E7070, E7820, LY186641, LY295501 y CQS mostraron altos coeficientes de correlación en actividades antiproliferativas contra cada línea celular de cáncer (Tabla 9). Por tanto, por este análisis se consideró que E7070, E7820, LY186641, LY295501 y CQS tenían los mismos mecanismos de acción o similares, sugiriendo
 20 claramente que dan las mismas alteraciones y efectos genéticos o similares.

Tabla 9

	F7070	E7870	COS	LY186641	LY295501
E7070	1,00	0,98	0,97	0,93	0,80
E7820	0,98	1,00	0,96	0,95	0,82
CQS	0,97	0,96	1,00	0,92	0,82
LY 186641	0,93	0,95	0,92	1,00	0,81
LY795501	0,80	0,82	0,82	0,81	1,00

25 La Tabla 9 muestra coeficientes de correlación entre los compuestos (E7070, E7820, CQS, LY 186641 y LY295501) en los paneles de líneas celulares de cáncer humano.

EJEMPLO 10: Resistencia cruzada en la línea celular resistente a E7070

30 Se usó una línea celular resistente a E7070 para evaluar las actividades antiproliferativas de E7820, LY186641, LY295501, LY-ASAP y CQS. HCT116-C9 era una subcepa separada de HCT116 derivada de cáncer de colon humano (Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA, EE.UU.). Esta HCT116-C9 se cultivó en presencia de E7070 mientras que se aumentaba la concentración de E7070 por grados, obteniéndose así las subcepas resistentes a E7070 HCT116-C9-C1 y HCT116-C9-C4 (Molecular Cancer Therapeutics, 2002, 1, 275-286).

35 Se sembraron tres líneas celulares, es decir, HCT116-C9, HCT116-C9-C1 y HCT116-C9-C4, a 3000 células/pocillo en una microplaca de 96 pocillos (fondo plano) (50 µl/pocillo). Veinticuatro horas después se añadieron con una serie de dilución triple de cada compuesto (50 µl/pocillo). Setenta y dos horas después se evaluaron las actividades antiproliferativas por el procedimiento de MTT (Mossmann T., J. Immunol. Methods, 1983, 65, 55-63). Las concentraciones inhibitorias del crecimiento al 50% para todas las células cancerosas se obtuvieron por un
 40 procedimiento de mínimos cuadrados.

Como resultado, la actividad antiproliferativa, es decir, CI_{50} , de E7070 para HCT116-C9 (C9) fue 0,127 µM. Por otra parte, las actividades para HCT116-C9-C1 (C9C1) y HCT116-C9-C4 (C9C4) fueron $CI_{50} = 31,9$ µM y 26,9 µM, respectivamente, confirmando que las actividades antiproliferativas de E7070 para C9C1 y C9C4 fueron sorprendentemente bajas (Figura 13). Las actividades antiproliferativas de E7820, CQS, LY186641, LY295501 y LY-ASAP para HCT116-C9 fueron $CI_{50} = 0,080$ µM, 1,73 µM, 33,6 µM, 10,9 µM y 1,63 µM, respectivamente, mientras que sus actividades para HCT116-C9-C1 fueron $CI_{50} = 51,2$ µM, 634 µM, 134 µM, 111 µM y 113 µM, respectivamente, y sus actividades para HCT116-C9-C4 fueron $CI_{50} = 52,8$ µM, 517 µM, 138 µM, 110 µM y 90,3 µM, respectivamente. Por tanto, las actividades antiproliferativas de E7820, CQS, LY186641, LY295501 y LY-ASAP para
 45 C9C1 y C9C4 fueron mucho menores que aquellas para C9 (Figura 13). Por tanto, se consideró que E7070, E7820, LY186641, LY295501, LY-ASAP y CQS tenían los mismos mecanismos de acción o similares, sugiriendo claramente
 50

que dan las mismas alteraciones y efectos genéticos o similares.

EJEMPLO 11: Resistencia cruzada en la línea celular resistente a E7070

- 5 En exactamente del mismo modo que en el Ejemplo 10, una línea celular resistente a E7070 se usó para evaluar las actividades antiproliferativas de LY573636, además de las de E7070.

10 Como resultado se confirmó de nuevo que las actividades antiproliferativas de E7070 para HCT116-C9-C1 y HCT116-C9-C4 ($CI_{50} = 32,7 \mu\text{M}$ y $28,0 \mu\text{M}$, respectivamente) eran sorprendentemente más bajas que la actividad para HCT116-C9 ($CI_{50} = 0,127 \mu\text{M}$) (Figura 14). Las actividades antiproliferativas de LY573636 para HCT116-C9-C1 y HCT116-C9-C4 ($CI_{50} = 264 \mu\text{M}$ y $240 \mu\text{M}$, respectivamente) también fueron sorprendentemente más bajas que la actividad para HCT116-C9 ($CI_{50} = 5,11 \mu\text{M}$) (Figura 14). Por tanto, se consideró que LY573636 tenía el mismo mecanismo de acción o similar que el de E7070, sugiriendo claramente que da la misma alteración y efecto genético o similar.

15 Estos resultados (Ejemplos 7-11) confirmaron que E7070, E7820, LY186641, LY295501, LY-ASAP, LY573636, CQS o una combinación de los mismos dan las mismas alteraciones genéticas o similares y, por tanto, las mismas acciones y efectos o similares.

20 Por consiguiente, similar a E7820 y E7070 (Ejemplos 1-6, 12 y 13), se encontró que un compuesto de sulfonamida, preferentemente E7820, E7070, LY186641, LY295501, LY-ASAP, LY573636, CQS o una combinación de los mismos, mostraba una sorprendente actividad antitumoral tras el uso combinado con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF, preferentemente gefitinib, erlotinib o cetuximab.

25 EJEMPLO 12: Uso combinado de E7820 y cetuximab en el modelo de trasplante subcutáneo (*in vivo*) de la línea celular de cáncer de colon humano (WiDr)

30 Se cultivó la línea celular de cáncer de colon humano WiDr (obtenida de Dainippon Pharmaceutical) en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C a aproximadamente el 80% de confluencia, y las células se recogieron con tripsina-EDTA. Usando un tampón fosfato se prepararon 5×10^7 células/ml de suspensión, y cada 0,1 ml de la suspensión de células resultante se trasplantó subcutáneamente a un ratón sin pelo en la ijada de su cuerpo. Diez días después del trasplante, E7820 y cetuximab (Erbix[®] comprado de Merck) se administraron solos o en combinación. E7820 se administró por vía oral a 50 mg/kg dos veces al día durante 2 semanas, mientras que cetuximab se administró intraperitonealmente a 100 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas.

35 Se midieron los ejes principal y secundario de los tumores con el compás calibrador Digimatic (Mitsutoyo) y los volúmenes del tumor y los volúmenes relativos del tumor se calcularon según las siguientes fórmulas.

40 **Volumen del tumor VT = Eje principal del tumor (mm) x (eje secundario del tumor)² (mm²)/2**

Volumen relativo del tumor VRT = Volumen del tumor en el día de medida / volumen del tumor en el primer día de administración

45 Si se observó interacción estadísticamente significativa en el grupo de uso combinado por ANOVA bidireccional se consideró que existía un efecto sinérgico.

50 Como resultado, el uso combinado de E7820 y cetuximab mostró un efecto antitumoral superior en comparación con el efecto obtenido con E7820 o cetuximab solos (Tabla 10).

Tabla 10

Fármaco administrado	Volumen relativo del tumor en el día 15 Promedio \pm desviación estándar
Control (sin tratar)	4,1 \pm 0,7
E7820 50 mg/kg	3,3 \pm 0,6
Cetuximab 100 mg/kg	3,2 \pm 0,4
E7820 50 mg/kg + cetuximab 100 mg/kg	2,7 \pm 0,4

55 La Tabla 10 muestra efectos antitumorales obtenidos mediante el uso de E7820 solo, el uso de cetuximab solo y el uso combinado de E7820 y cetuximab en modelos de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer de colon humano (WiDr). El primer día de administración se consideró el día 1.

EJEMPLO 13: Uso combinado de E7820 y cetuximab en el modelo de trasplante subcutáneo (*in vivo*) de la línea celular de cáncer renal humano (ACHN)

Se cultivó la línea celular de cáncer renal humano ACHN (obtenida de Dainippon Pharmaceutical) en RPMI 1640 (que contenía SBF al 10%) en una estufa de incubación con 5% de dióxido de carbono a 37°C a aproximadamente el 80% de confluencia, y las células se recogieron con tripsina-EDTA. Usando un tampón fosfato se prepararon 1×10^8 células/ml de suspensión, y cada 0,1 ml de la suspensión de células resultante se trasplantó subcutáneamente a un ratón sin pelo en la ijada de su cuerpo. Ocho días después del trasplante, E7820 y cetuximab se administraron solos o en combinación. E7820 se administró por vía oral a 50 mg/kg dos veces al día durante 2 semanas, mientras que cetuximab se administró intraperitonealmente a 100 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas.

Se midieron los ejes principal y secundario de los tumores con el compás calibrador Digimatic (Mitsutoyo), y los volúmenes del tumor y los volúmenes relativos del tumor se calcularon según las siguientes fórmulas.

$$\text{Volumen del tumor VT} = \text{Eje principal del tumor (mm)} \times (\text{eje secundario del tumor})^2 (\text{mm}^2)/2$$

$$\text{Volumen relativo del tumor VRT} = \text{Volumen del tumor en el día de medida} / \text{volumen del tumor en el primer día de administración}$$

Si se observó interacción estadísticamente significativa en el grupo de uso combinado por ANOVA bidireccional se consideró que existía un efecto sinérgico

Como resultado, el uso combinado de E7820 y cetuximab mostró un efecto antitumoral superior en comparación con el efecto obtenido con E7820 o cetuximab solos (Tabla 11).

Tabla 11

Fármaco administrado	Volumen relativo del tumor en el día 15 Promedio \pm desviación estándar
Control (sin tratar)	2,0 \pm 0,2
E7820 50 mg/kg	1,3 \pm 0,2
Cetuximab 100 mg/kg	1,4 \pm 0,1
E7820 50 mg/kg + cetuximab 100 mg/kg	0,9 \pm 01

La Tabla 11 muestra efectos antitumorales obtenidos mediante el uso de E7820 solo, el uso de cetuximab solo y el uso combinado de E7820 y cetuximab en modelos de trasplante subcutáneo de la línea celular de cáncer renal humano (ACHN). El primer día de administración se consideró el día 1.

De los resultados obtenidos se confirmó que la combinación de E7820 y cetuximab proporcionó una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral, y un procedimiento para tratar cáncer, y, por tanto, la composición farmacéutica, el kit y el procedimiento de la invención pueden usarse para tratar cáncer.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La presente invención proporciona una composición farmacéutica y un kit que muestran una sorprendente actividad antitumoral

La composición farmacéutica y el kit son útiles para tratar cáncer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de sulfonamida en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF, en la que el compuesto de sulfonamida es:
- N-(3-cloro-1H-indol-7-il)-4-sulfamoilbencenosulfonamida, N-(3-ciano-4-metil-1H-indol-7-il)-3-cianobencenosulfonamida o una sal farmacológicamente aceptable de las mismas o un solvato de las mismas,
- 10 y en la que la sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF es gefitinib, erlotinib o cetuximab.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica se usa para tratar cáncer.
- 15 3. Un kit que comprende un conjunto de una formulación que comprende un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 y una formulación que comprende una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1.
4. El kit según la reivindicación 4 para uso en el tratamiento de cáncer.
- 20 5. Uso de un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 para producir una composición farmacéutica para uso en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.
- 25 6. Uso de una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 para producir una composición farmacéutica para uso en combinación con un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.
- 30 7. Un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 para uso en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.
8. Una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 para uso en combinación con un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.
- 35 9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 para uso en combinación con una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.
- 40 10. Una composición farmacéutica que comprende una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de EGF como se define en la reivindicación 1 para uso en combinación con un compuesto de sulfonamida como se define en la reivindicación 1 en el tratamiento de cáncer.

Figura 1

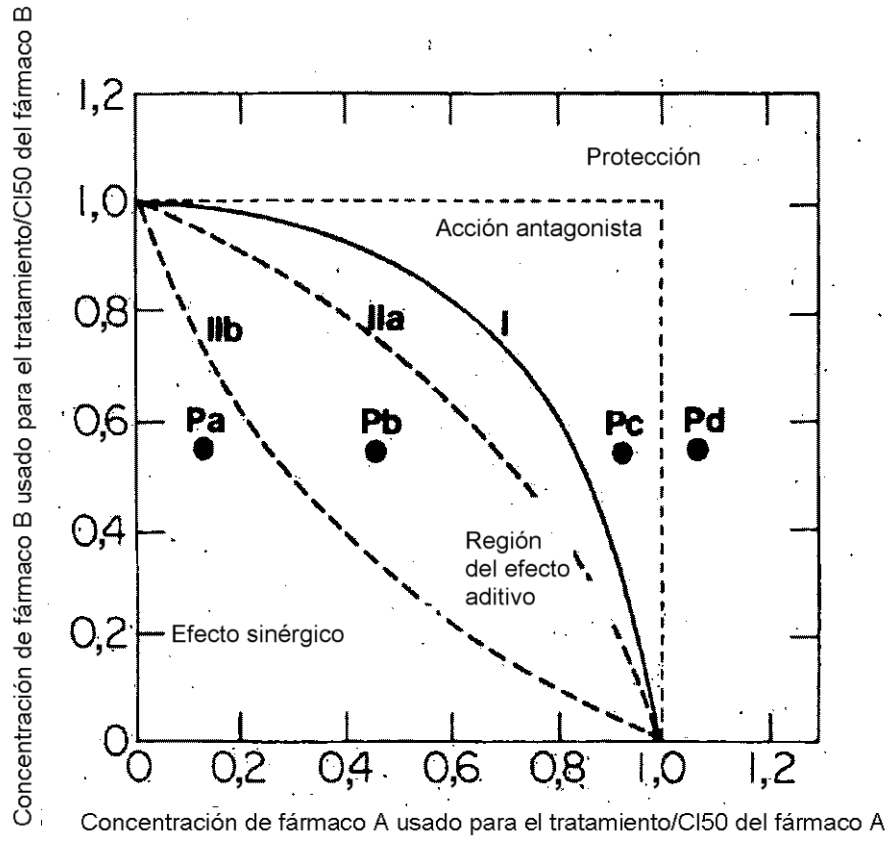


Figura 2

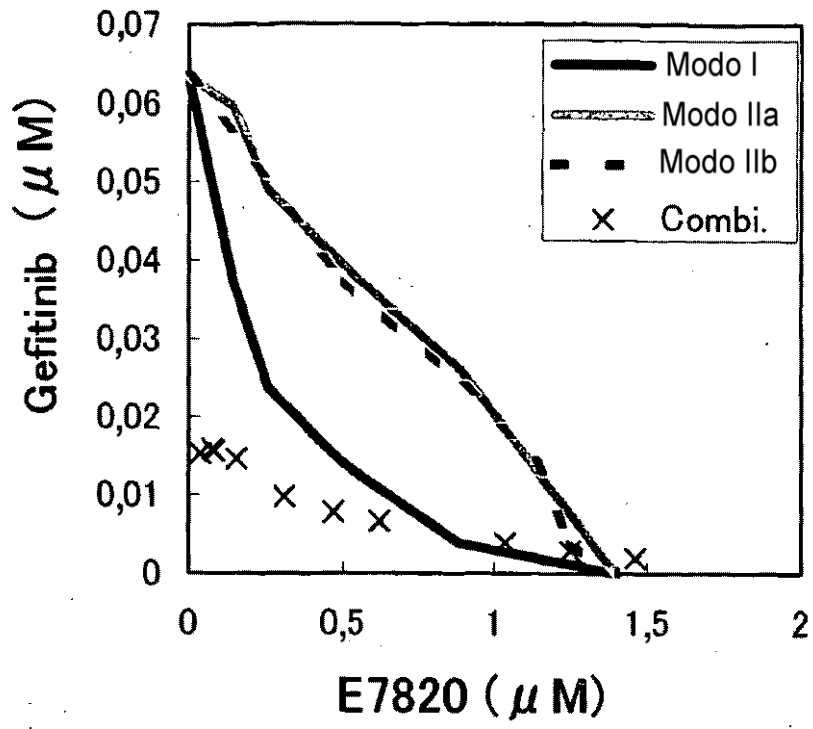


Figura 3

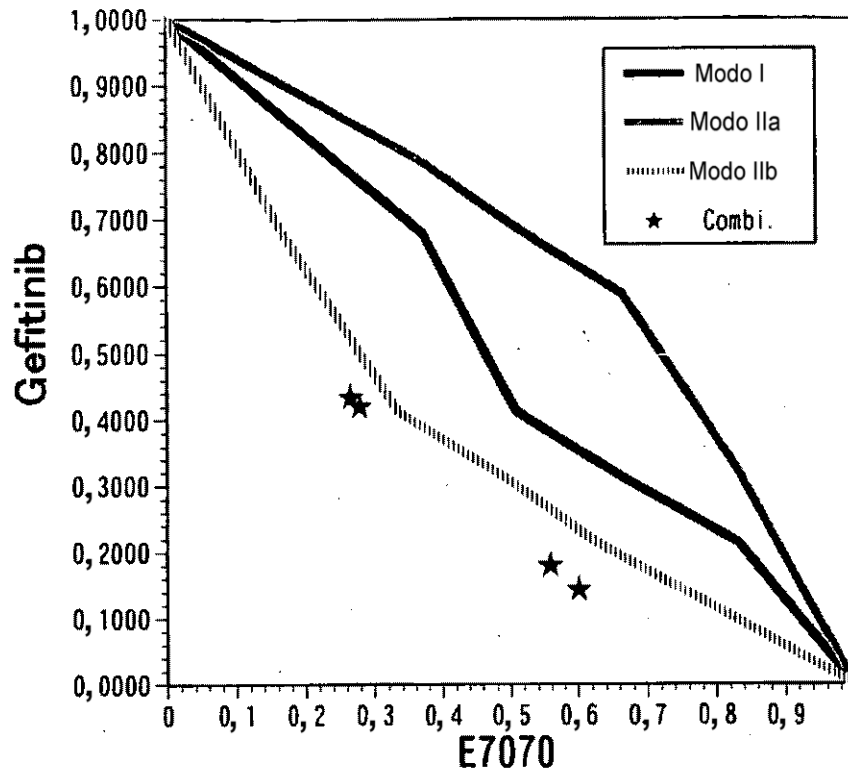


Figura 4

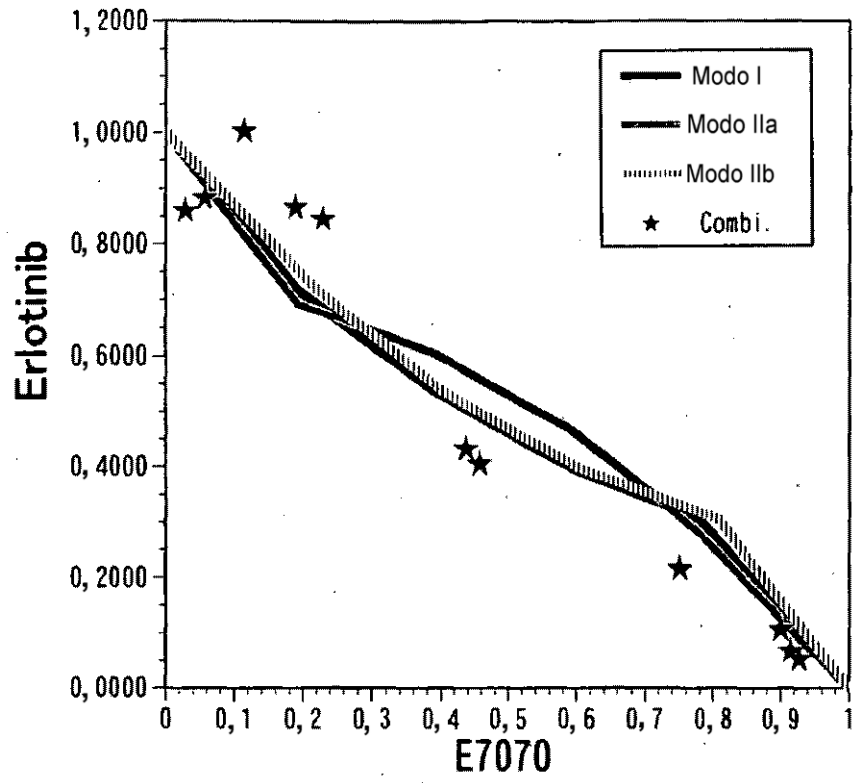


Figura 5

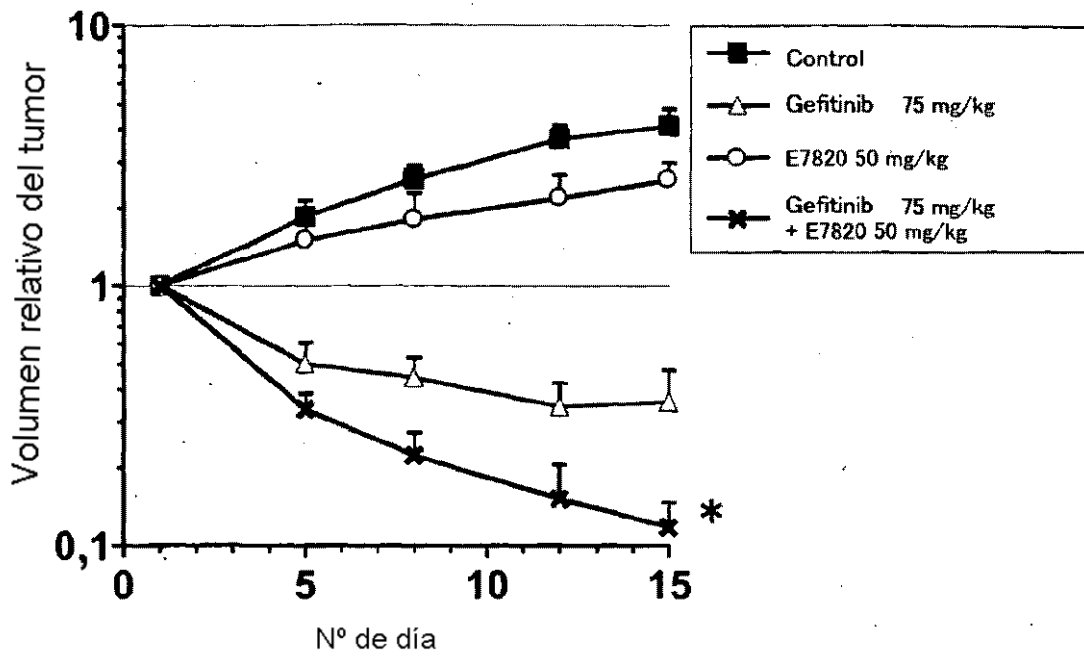


Figura 6

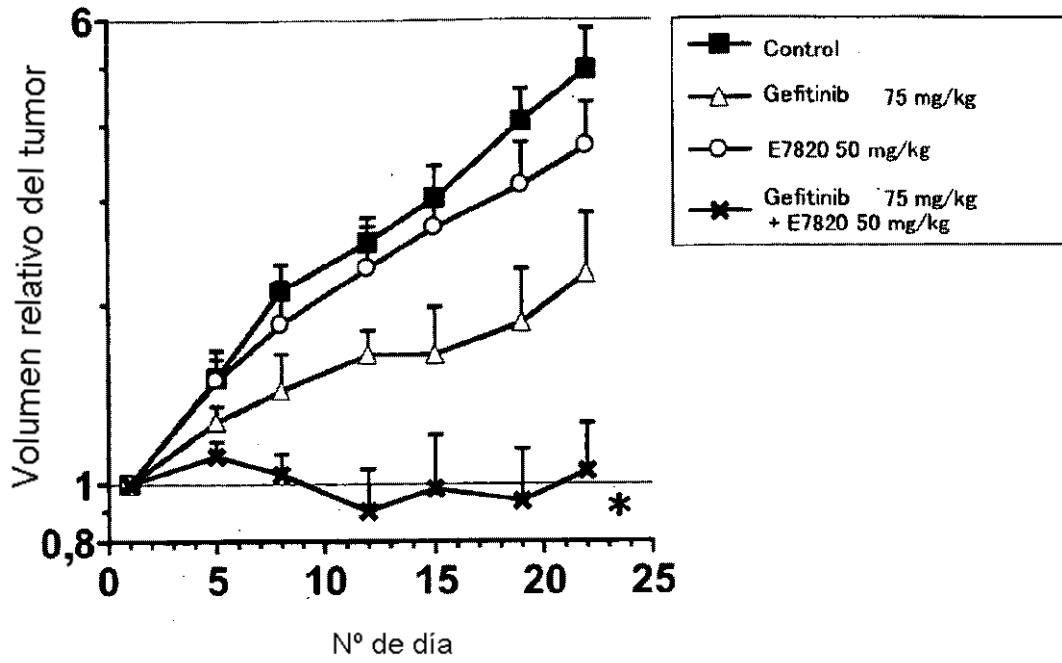


Figura 7

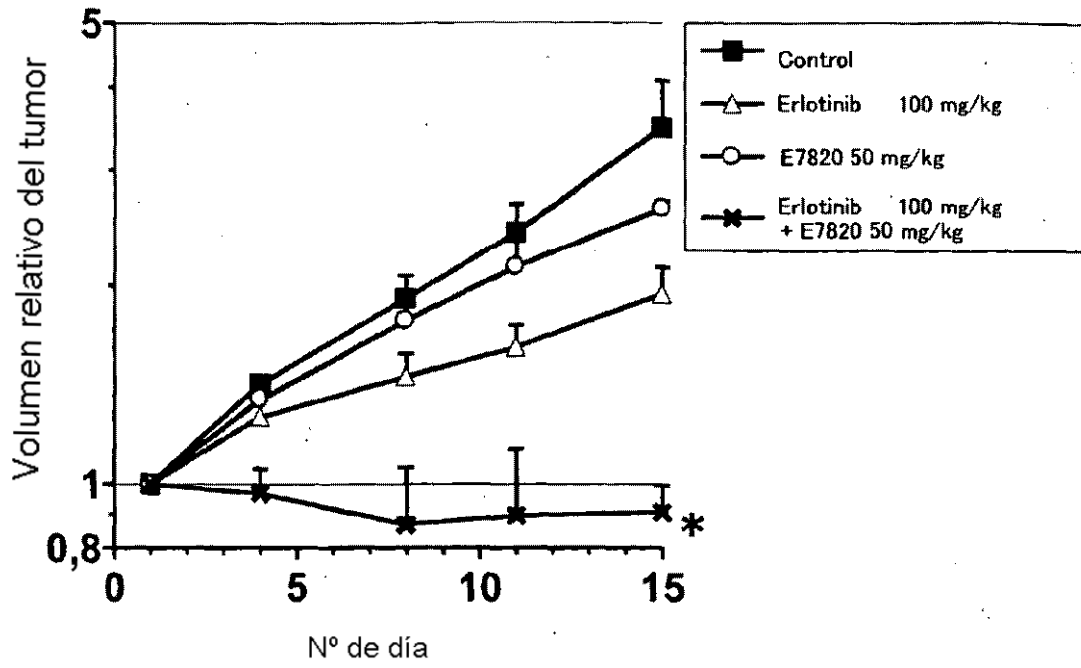


Figura 8

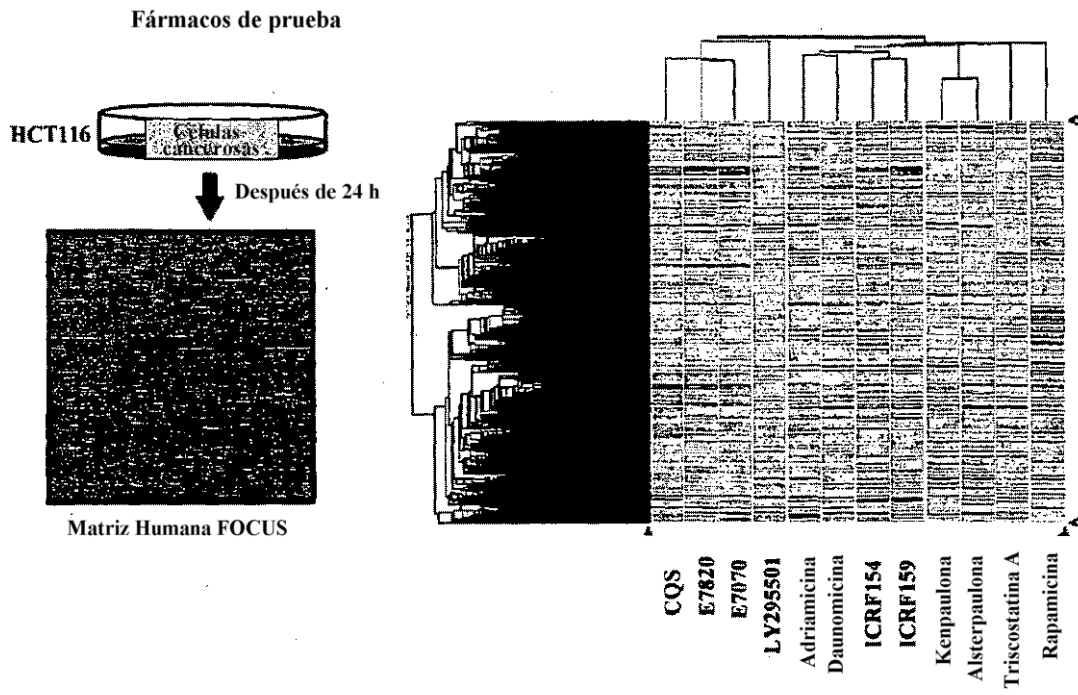


Figura 9

	E1070-1	E1070-2	E1820-1	E1820-2	E1820-3	EOS-1	EOS-2	EOS-3	LV1-1	LV1-2	LV2-1	LV2-2	LV2-3	LV5-1	LV5-2	LV5-3	GAI-1	GAI-2	GA-1	GA-2	Cap-1	Cap-2	MST-1	MST-2	MST-3	Etop-1	Etop-2	TSA-1	TSA-2	Kemp-1	Kemp-2				
E1070-1	1,00	0,85	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,87	0,83	0,83	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,16	0,17	0,17	0,17	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11			
E1070-2	0,95	1,00	0,87	0,88	0,87	0,88	0,87	0,88	0,83	0,83	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,17	0,17	0,17	0,17	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11		
E1820-1	0,87	0,87	1,00	0,96	0,90	0,90	0,90	0,90	0,88	0,88	0,83	0,82	0,88	0,88	0,88	0,09	0,09	0,09	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07		
E1820-2	0,87	0,86	0,96	1,00	0,90	0,90	0,90	0,90	0,88	0,88	0,83	0,82	0,88	0,88	0,88	0,09	0,09	0,09	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	
EOS-1	0,87	0,87	0,90	0,90	1,00	0,96	0,97	0,87	0,87	0,87	0,84	0,83	0,80	0,80	0,80	0,13	0,14	0,14	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		
EOS-2	0,87	0,87	0,90	0,90	0,90	1,00	0,96	0,87	0,87	0,87	0,84	0,83	0,80	0,80	0,80	0,14	0,14	0,14	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10		
LV1-1	0,83	0,83	0,83	0,86	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	0,97	0,82	0,81	0,89	0,89	0,89	0,26	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24		
LV1-2	0,83	0,83	0,83	0,86	0,87	0,87	0,87	0,87	1,00	0,97	0,82	0,81	0,89	0,89	0,89	0,26	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	
LV2-1	0,86	0,86	0,86	0,83	0,84	0,84	0,82	0,82	0,82	1,00	0,84	0,85	0,85	0,85	0,85	0,20	0,20	0,20	0,20	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	
LV2-2	0,86	0,85	0,82	0,82	0,83	0,83	0,81	0,81	0,81	0,94	1,00	0,84	0,84	0,84	0,84	0,19	0,19	0,19	0,19	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
LV5-1	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
LV5-2	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
GA-1	0,18	0,17	0,09	0,09	0,13	0,14	0,14	0,14	0,25	0,25	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,70	0,69	0,68	0,68	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	
GA-2	0,17	0,17	0,08	0,08	0,14	0,14	0,14	0,14	0,25	0,25	0,20	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,70	0,69	0,68	0,68	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	
Cap-1	0,11	0,11	0,07	0,07	0,10	0,10	0,10	0,10	0,24	0,24	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	
Cap-2	0,11	0,11	0,07	0,07	0,10	0,10	0,10	0,10	0,24	0,24	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	
MST-1	0,35	0,35	0,28	0,27	0,37	0,37	0,37	0,37	0,30	0,30	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,38	0,38	0,38	0,38	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
MST-2	0,35	0,35	0,28	0,27	0,37	0,37	0,37	0,37	0,30	0,30	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,38	0,38	0,38	0,38	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Etop-1	0,18	0,16	0,08	0,08	0,18	0,18	0,18	0,18	0,12	0,12	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Etop-2	0,17	0,17	0,08	0,08	0,18	0,18	0,18	0,18	0,12	0,12	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
TSA-1	0,31	0,31	0,24	0,24	0,32	0,32	0,32	0,32	0,25	0,25	0,34	0,33	0,34	0,34	0,34	0,34	0,25	0,25	0,25	0,25	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
TSA-2	0,31	0,31	0,24	0,24	0,32	0,32	0,32	0,32	0,25	0,25	0,34	0,33	0,34	0,34	0,34	0,34	0,25	0,25	0,25	0,25	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Kemp-1	0,32	0,32	0,20	0,21	0,29	0,29	0,29	0,29	0,25	0,25	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,25	0,25	0,25	0,25	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Kemp-2	0,32	0,33	0,21	0,21	0,29	0,29	0,29	0,29	0,25	0,25	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,25	0,25	0,25	0,25	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14



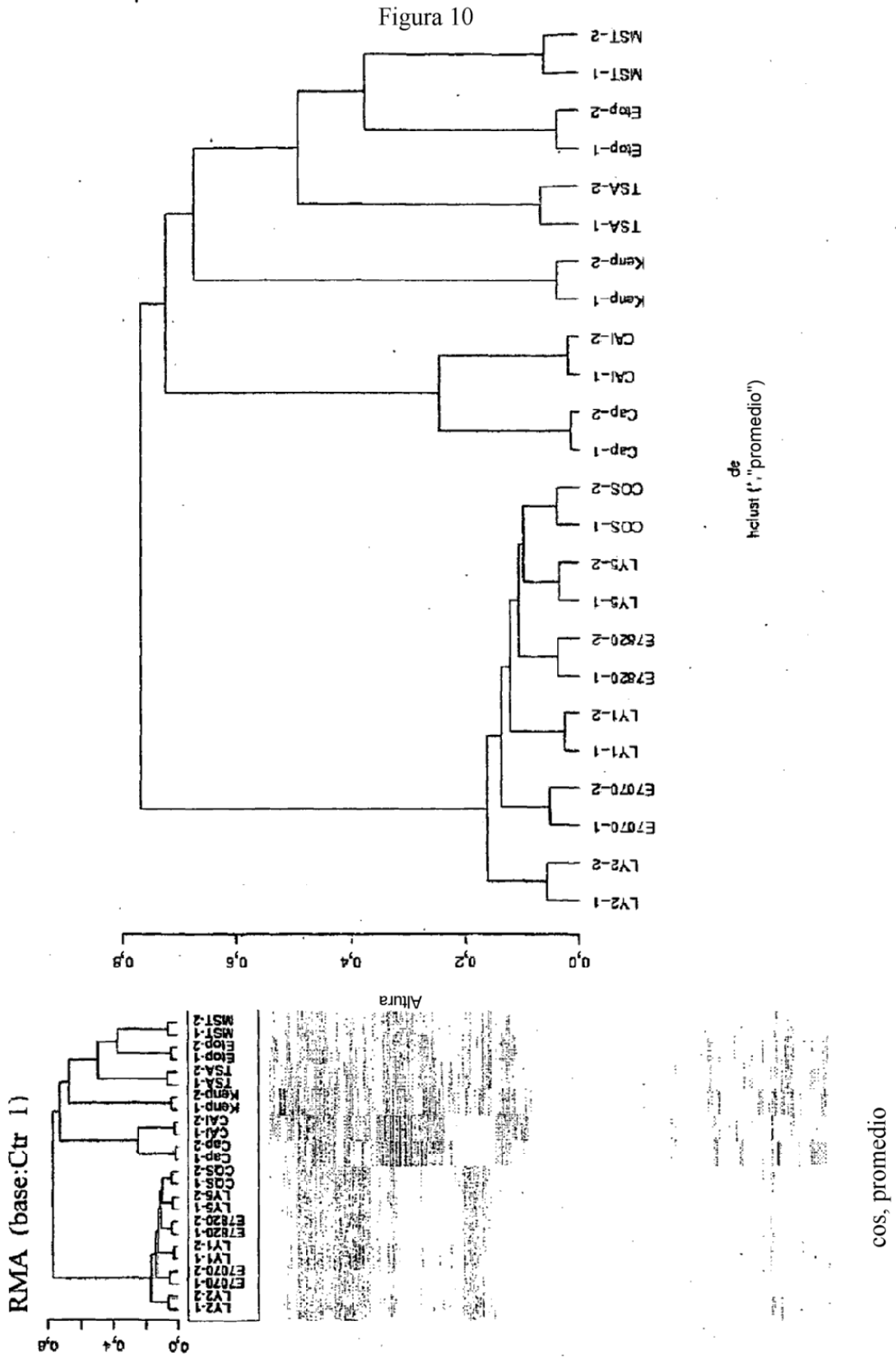


Figura 11

	E700-1	E700-2	E720-1	E720-2	COS-1	COS-2	LY1-1	LY1-2	LY2-1	LY2-2	LY3-1	LY3-2	CA-1	CA-2	Cap-1	Cap-2	MST-1	MST-2	Etap-1	Etap-2	ISA-1	ISA-2	ISA-3	Kemp-1	Kemp-2
E700-1	1,00	0,94	1,00	0,87	0,96	0,86	0,81	0,81	0,84	0,83	0,85	0,86	0,84	0,04	0,03	0,04	0,74	0,24	0,06	0,06	0,22	0,22	0,22	0,19	0,19
E700-2	0,94	1,00	0,86	0,87	0,85	0,85	0,81	0,81	0,84	0,83	0,85	0,86	0,84	0,04	0,03	0,04	0,24	0,23	0,06	0,06	0,22	0,22	0,22	0,19	0,19
E720-1	0,87	0,86	1,00	0,96	0,90	0,90	0,86	0,86	0,81	0,80	0,87	0,87	0,87	0,00	0,02	0,03	0,22	0,22	0,03	0,04	0,21	0,22	0,22	0,18	0,20
E720-2	0,87	0,86	0,96	1,00	0,90	0,90	0,86	0,86	0,81	0,80	0,87	0,87	0,87	0,00	0,02	0,03	0,22	0,22	0,03	0,04	0,21	0,22	0,22	0,18	0,20
COS-1	0,86	0,85	0,90	0,96	1,00	0,86	0,86	0,81	0,80	0,87	0,87	0,87	0,87	0,00	0,02	0,03	0,22	0,22	0,03	0,04	0,21	0,22	0,22	0,18	0,20
COS-2	0,86	0,85	0,90	0,96	0,85	1,00	0,86	0,86	0,81	0,80	0,87	0,87	0,87	0,00	0,02	0,03	0,22	0,22	0,03	0,04	0,21	0,22	0,22	0,18	0,20
LY1-1	0,81	0,81	0,86	0,85	0,85	0,85	1,00	0,80	0,80	0,83	0,83	0,83	0,83	0,09	0,07	0,08	0,23	0,23	0,07	0,08	0,24	0,24	0,24	0,19	0,20
LY1-2	0,81	0,81	0,86	0,85	0,85	0,85	0,80	1,00	0,80	0,83	0,83	0,83	0,83	0,09	0,07	0,08	0,23	0,23	0,07	0,08	0,24	0,24	0,24	0,19	0,20
LY2-1	0,84	0,84	0,80	0,80	0,81	0,81	0,78	0,78	1,00	0,82	0,82	0,82	0,82	0,08	0,08	0,08	0,28	0,28	0,11	0,12	0,24	0,24	0,24	0,19	0,20
LY2-2	0,83	0,83	0,80	0,80	0,81	0,81	0,78	0,78	0,82	1,00	0,86	0,86	0,86	0,09	0,09	0,09	0,28	0,28	0,11	0,12	0,24	0,24	0,24	0,19	0,20
LY3-1	0,86	0,86	0,87	0,87	0,88	0,88	0,87	0,87	0,83	0,82	1,00	0,86	0,86	0,09	0,09	0,09	0,28	0,28	0,11	0,12	0,24	0,24	0,24	0,19	0,20
LY3-2	0,86	0,86	0,87	0,87	0,88	0,88	0,87	0,87	0,83	0,82	0,86	1,00	0,86	0,09	0,09	0,09	0,28	0,28	0,11	0,12	0,24	0,24	0,24	0,19	0,20
CA-1	0,04	0,04	0,00	0,06	0,02	0,02	0,13	0,13	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,74	0,74	0,74	0,25	0,25	0,25	0,25	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14
CA-2	0,04	0,04	0,00	0,06	0,02	0,02	0,13	0,13	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,74	0,74	0,74	0,25	0,25	0,25	0,25	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14
Cap-1	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,19	0,19	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	1,00	1,00	1,00	0,28	0,28	0,28	0,28	0,12	0,12	0,12	0,08	0,08
Cap-2	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,19	0,19	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,74	0,74	0,74	0,28	0,28	0,28	0,28	0,12	0,12	0,12	0,08	0,08
MST-1	0,24	0,24	0,22	0,22	0,24	0,24	0,20	0,20	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,28	0,28	0,28	1,00	0,82	0,57	0,57	0,50	0,50	0,50	0,24	0,25
MST-2	0,23	0,23	0,22	0,22	0,24	0,24	0,20	0,20	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,28	0,28	0,28	0,82	1,00	0,57	0,57	0,50	0,50	0,50	0,24	0,25
Etap-1	0,06	0,06	0,03	0,03	0,07	0,07	0,04	0,04	0,07	0,07	0,11	0,11	0,11	0,25	0,25	0,25	0,57	0,57	1,00	0,81	0,38	0,38	0,38	0,12	0,13
Etap-2	0,06	0,06	0,04	0,04	0,07	0,07	0,04	0,04	0,08	0,08	0,12	0,12	0,12	0,25	0,25	0,25	0,57	0,57	0,81	1,00	0,38	0,38	0,38	0,12	0,13
ISA-1	0,22	0,22	0,21	0,21	0,25	0,25	0,17	0,17	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,13	0,13	0,13	0,50	0,50	0,38	0,38	1,00	0,93	0,93	0,21	0,22
ISA-2	0,22	0,22	0,21	0,21	0,25	0,25	0,17	0,17	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,13	0,13	0,13	0,50	0,50	0,38	0,38	0,93	1,00	0,93	0,21	0,22
Kemp-1	0,19	0,19	0,12	0,12	0,17	0,17	0,15	0,15	0,20	0,20	0,19	0,19	0,19	0,14	0,14	0,14	0,24	0,24	0,12	0,12	0,21	0,22	0,22	0,09	0,09
Kemp-2	0,19	0,19	0,12	0,12	0,17	0,17	0,15	0,15	0,20	0,20	0,19	0,19	0,19	0,14	0,14	0,14	0,24	0,24	0,12	0,12	0,21	0,22	0,22	0,09	0,09

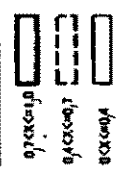


Figura 12

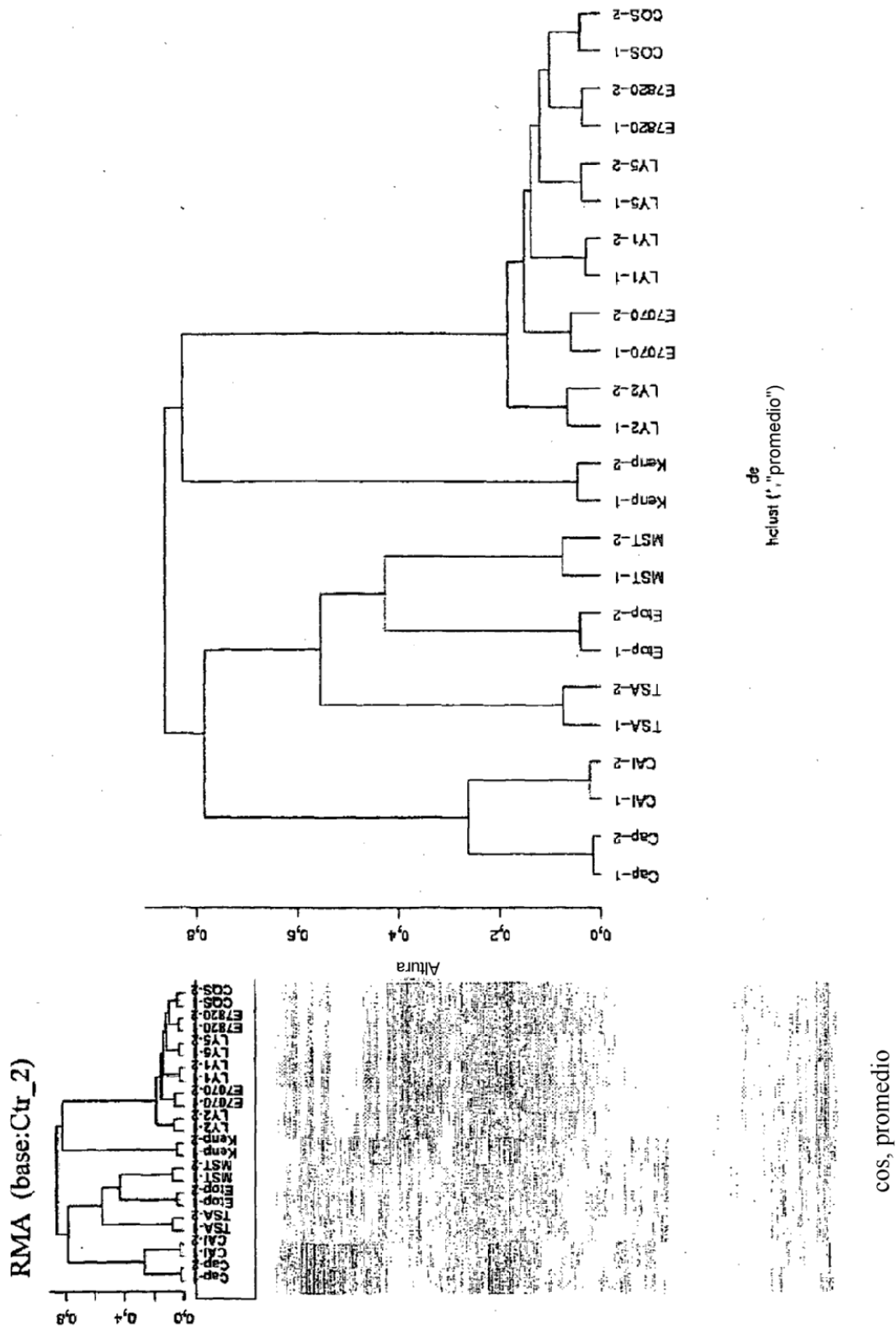


Figura 13

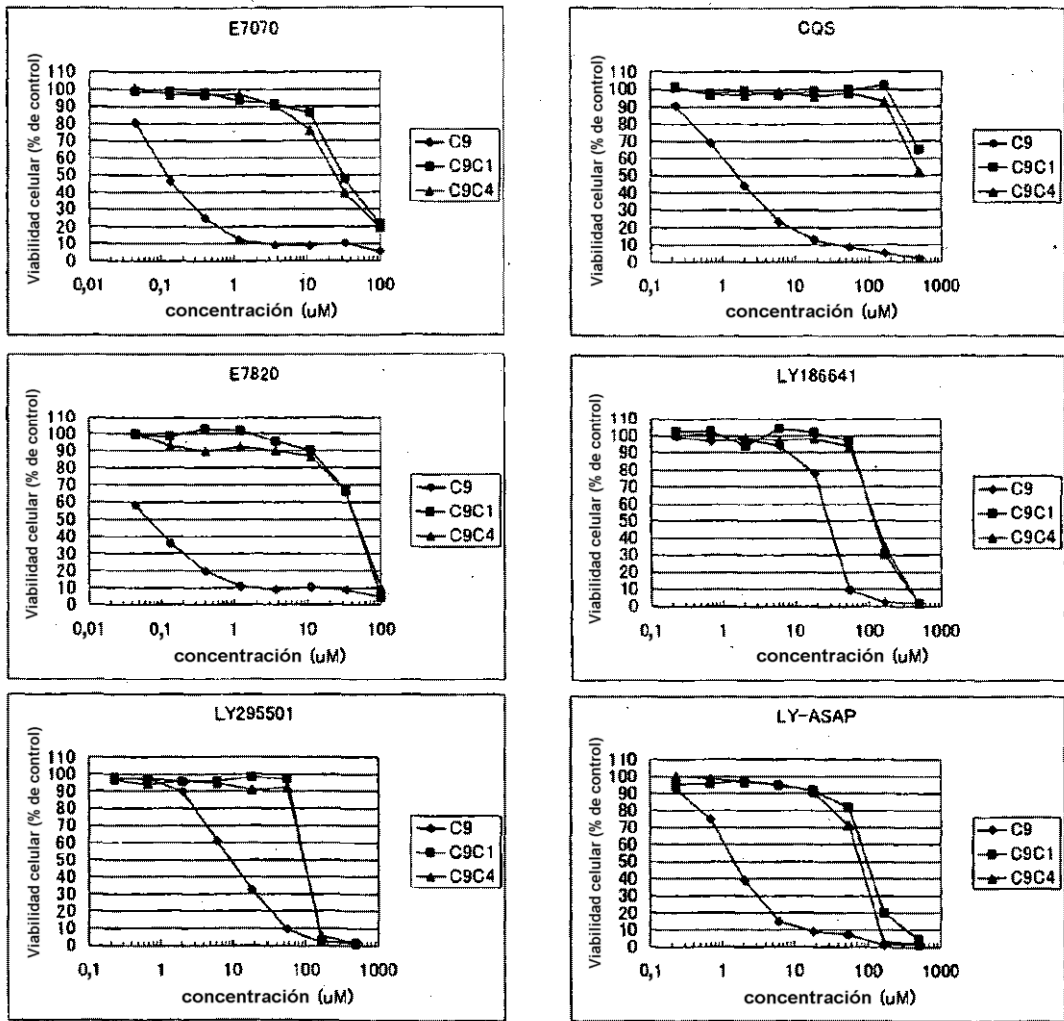


Figura 14

