



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 381 408**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03712731 .3**

96 Fecha de presentación : **17.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1488795**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Remedios para el cáncer de pulmón.**

30 Prioridad: **18.03.2002 JP 2002-74962**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.05.2012

73 Titular/es:
DAINIPPON SUMITOMO PHARMA Co., Ltd.
6-8, Dosho-Machi
2-chome, Chuo-ku Osaka-shi
Osaka 541-8524, JP

72 Inventor/es: **Noguchi, Toshihiro y**
Baba, Akemi

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 381 408 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

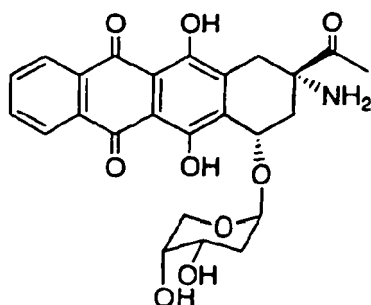
Remedios para el cáncer de pulmón.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, que comprende amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo, para la utilización en combinación con otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.

10 **Antecedentes de la técnica**

15 La amrubicina ((+)-(7S,9S)-9-acetil-9-amino-7-[(2-deoxi-β-D-eritro-pentopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,11-dihidroxi-5,12-naftacendiona) es un compuesto antraciclina representado por la fórmula química estructural siguiente (documento JP 3-5397B, patente US 4.673.668):



20 La amrubicina se reduce fácilmente *in vivo*, formando un metabolito (el amrubicinol), que es un producto 13-hidroxilado. El amrubicinol presenta una actividad inhibitora considerablemente más fuerte contra el crecimiento de las células tumorales que la amrubicina. La doxorubicina y la daunomicina, los otros compuestos antraciclina, también forman metabolitos reducidos, que en contraste presentan actividades bajas (Cancer Chemother. Pharmacol. 30:51-57, 1992). Asimismo, para la toxicidad cardíaca, la amrubicina resulta mucho más débil que la doxorubicina en el modelo experimental crónico en el conejo (Invest. New Drug 15:219-225, 1997).

25 Se ha conocido que, aunque los compuestos antraciclina presentan estructuras similares, son diferentes en sus indicaciones, mecanismos de acción y otros, tal como se describe a continuación. La daunorrubicina y la idarrubicina han sido aprobadas para el tratamiento de la leucemia, pero no para el tratamiento de los cánceres sólidos. Por otra parte, la doxorubicina, la epirubicina, la pirarrubicina y la aclarubicina han sido aprobadas para el tratamiento de los cánceres sólidos. La daunorrubicina y la doxorubicina inhiben la síntesis del ADN y del ARN en grados similares, mientras que la aclarubicina y la marcelomicina inhiben la síntesis del ARN más fuertemente que la síntesis del ADN; por lo tanto, los mecanismos por los que ejercen actividad antitumoral son considerablemente diferentes (JJSHP 27:1087-1110, 1991). De esta manera, es conocido que, incluso en el caso de que los fármacos pertenezcan a la misma categoría de la antraciclina, presentan un efecto diferente dependiendo del tipo de cáncer, y el mismo agente anticáncer presenta un efecto diferente según el tipo de cáncer. Por lo tanto, resulta necesario confirmar específicamente de modo experimental si un agente anticáncer específico resulta efectivo contra un tumor (cáncer) específico.

30 Se ha descrito que un uso del hidrocloreuro de amrubicina en combinación con cisplatino o similar muestra un efecto aditivo sobre la cepa celular MOLT-3 de leucemia de las células T humanas y sobre la cepa celular MG-63 de osteosarcoma humano (Investigational New Drugs 14:357-363, 1996). Además, se ha descrito un efecto, en un experimento con la cepa celular P388 de leucemia murina, con el uso combinado de amrubicina y cisplatino *in vivo* (Yoshikazu YANAGI *et al.*, resúmenes de publicaciones de la Japanese Cancer Association, n° 2168, 1989). Sin embargo, ningún informe describe un uso combinado de amrubicina y otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, contra el cáncer de pulmón y en relación a los efectos secundarios.

35 **Exposición de la invención**

40 El problema que debe resolver la presente invención consiste en proporcionar un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón con un efecto terapéutico antitumoral creciente y unos efectos secundarios reducidos.

45 Como resultado de estudios exhaustivos, se ha descubierto que los cánceres de pulmón pueden curarse notablemente sin incrementar los efectos secundarios observados en el uso individual de agentes, al utilizar en combinación amrubicina y otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, y que los efectos secundarios pueden reducirse drásticamente al reducirse las dosis respectivas, manteniendo el efecto terapéutico en el uso combinado de amrubicina y otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón. Además, se ha descubierto asimismo que el nivel de expresión del gen de la carbonilreductasa 1, el producto del cual puede convertir la amrubicina en su

ES 2 381 408 T3

metabolito activo el amrubicinol, es más elevado en las células de cáncer de pulmón, tal como el cáncer pulmonar de células pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar de células escamosas y el carcinoma pulmonar de células grandes, que en las células pulmonares normales y que en las células leucémicas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se ha descubierto que la amrubicina se convierte selectivamente en amrubicinol y funciona en las células de cáncer de pulmón más que en células pulmonares normales o que en células leucémicas, y de esta manera, los efectos secundarios resultan reducidos por la presente invención.

La presente invención se ha completado de acuerdo con los conocimientos anteriormente proporcionados.

Es decir, la presente invención se refiere a:

[1] la utilización de amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón para la utilización en combinación con otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, en la que otro medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón es el irinotecán, la vinorelbina o la gemcitabina.

[2] La utilización según [1], en la que el cáncer de pulmón es el cáncer pulmonar de células pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar de células escamosas o el carcinoma pulmonar de células grandes.

[3] La utilización según [1], en la que el cáncer de pulmón es el cáncer pulmonar de células pequeñas o el carcinoma pulmonar de células escamosas.

[4] La utilización según cualquiera de [1] a [3], en la que la amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el hidrocloreuro de amrubicina.

[5] La utilización según cualquiera de [1] a [4] para la preparación de un medicamento que se administra simultáneamente, separadamente o secuencialmente con el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.

[6] La utilización según cualquiera de [1] a [5] para la preparación de un medicamento destinado a un paciente portador de un cáncer de pulmón para el que se ha administrado, o se planifica la administración de otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.

[7] La utilización según cualquiera de [1] a [6] para la preparación de un medicamento envasado de manera que entre aproximadamente 60 y aproximadamente 150 mg/m² de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administren en una única dosis o en 2 a 5 dosis divididas.

[8] La utilización según [7] para la preparación de un medicamento envasado de manera que entre aproximadamente 80 y aproximadamente 130 mg/m², preferentemente entre aproximadamente 110 y aproximadamente 130 mg/m² de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administren en una única dosis.

[9] La utilización según [7] para la preparación de un medicamento envasado de manera que entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 mg/m², preferentemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 45 mg/m², más preferentemente entre aproximadamente 35 y aproximadamente 45 mg/m², de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administren una vez al día durante 3 días.

[10] La utilización según [9], en la que la amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra durante 3 días continuamente.

[11] La utilización según cualquiera de [1] a [10], en la que el otro medicamento para tratar el cáncer de pulmón se administra en un uso combinado de entre aproximadamente 0,4 veces y aproximadamente 1,0 vez la dosis máxima tolerada, o entre 0,4 veces y aproximadamente 1,0 vez la dosis máxima administrada.

[12] La utilización según cualquiera de [1] a [11] para la preparación de un medicamento destinado a un paciente que presenta un cáncer de pulmón, en el que el paciente no ha continuado recibiendo el tratamiento con el otro medicamento destinado al tratamiento de cáncer de pulmón debido a los efectos secundarios, y en la que el paciente está recibiendo la administración de dicho otro medicamento en una cantidad que conducirá a una reducción de los efectos secundarios.

[13] Un producto que comprende amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón para la utilización simultánea, separada o secuencia en el tratamiento del cáncer de pulmón, en el que el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón es el irinotecán, la vinorelbina o la gemcitabina.

[14] Un producto destinado al tratamiento del cáncer de pulmón según [13],

en el que la amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es hidrocloreuro de amrubicina.

ES 2 381 408 T3

El medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón de la invención es un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón que comprende amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma a modo de principio activo y se utiliza en combinación con otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.

La amrubicina o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma pueden prepararse, por ejemplo, según J. Org. Chem. 52:4477-4485, 1987. Entre las sales farmacéuticamente aceptables de la amrubicina se incluyen las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, las sales de ácidos inorgánicos, tales como las sales hidrocioruro, hidrobromuro, sulfato, hidroyoduro, nitrato, fosfato y similares, y sales de ácido orgánico, tales como citrato, oxalato, acetato, formato, propionato, benzoato, trifluoroacetato, fumarato, maleato, tartrato, aspartato, glutamato, metanosulfonato, bencenosulfonato, canforsulfonato y similares. Las sales de adición de base incluyen, por ejemplo, sales de adición de base inorgánica, tales como sal sódica, sal potásica, sal cálcica, sal de magnesio, sal amónica y similares; y sales de adición de base orgánica, tales como sal trietilamonio, sal trietanolamonio, sal piridinio, sal diisopropilamonio y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas incluyen el hidrocioruro y similares.

La dosis máxima tolerada de la amrubicina o de las sales farmacéuticamente aceptables de la misma es, con referencia al hidrocioruro de amrubicina, de 25 mg/kg (75 mg/m²) para los ratones y de 130 mg/m² para el ser humano, en una dosis única una vez al día, y de 50 mg/m² al día para la administración continua durante 3 días.

Otro medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón es un inhibidor de la ADN topoisomerasa I, es decir el irinotecán; un inhibidor de la polimerización de la tubulina, es decir la vinorelbina, o un antimetabolito, es decir la gemcitabina.

El otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón se indica a continuación:

Irinotecán: documento JP 60-19790A, patente US n° 4.604.463, J. Clin. Oncol. 11:909, 1993.

Vinorelbina: documento JP 55-31096A, patente US n° 4.307.100, Cancer Letters 27:285, 1985.

Gemcitabina: patente US n° 4.808.614, Cancer Treat. Rev. 19:45-55, 1993.

5-FU (5-fluorouracilo).

La dosis máxima tolerada del irinotecán es de 120 mg/kg para ratones y la dosis máxima tolerada para el ser humano es de, por ejemplo, 150 mg/m² a intervalos de una semana y de 350 mg/m² a intervalos de 3 semanas. La dosis máxima tolerada de la vinorelbina es de 16 mg/kg para ratones y la dosis máxima administrada para el ser humano es de 25 mg/m². La dosis máxima tolerada de la gemcitabina es de 300 mg/kg/dosis para ratones y la dosis máxima administrada en el ser humano es de 1.000 mg/m.

Los cánceres de pulmón incluyen, por ejemplo, el cáncer pulmonar de células pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar de células escamosas, el carcinoma pulmonar de células grandes, los carcinoides, el carcinoma quístico adenoide, el carcinoma mucoepidermoide, el tumor mixto maligno y similares. De entre ellos, algunos ejemplos en los que el medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón de la invención muestra un efecto preferido son el cáncer pulmonar de células pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar de células escamosas, el carcinoma pulmonar de células grandes y similares, y uno particularmente preferido es el cáncer pulmonar de células pequeñas y el carcinoma pulmonar de células escamosas.

A partir de los resultados de los Ejemplos 1 a 3 con ratones, se realizaron las observaciones siguientes:

(1) En una utilización combinada de 0,5 veces (12,5 mg/kg) de la dosis máxima tolerada de hidrocioruro de amrubicina y de 0,5 veces la dosis máxima tolerada del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, se observó un efecto anticáncer a un nivel similar al del encontrado en grupos en los que la dosis máxima tolerada de cada uno de los agentes respectivos se había administrado individualmente. Por otra parte, los efectos secundarios de los mismos se redujeron significativamente.

(2) En una utilización combinada de 0,8 veces o de 1,0 vez (20 ó 25 mg/kg) de la dosis máxima tolerada de hidrocioruro de amrubicina y de 0,8 veces o de 1,0 vez la dosis máxima tolerada del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, se observó un efecto anticáncer más fuerte que los observados en grupos en los que se administró individualmente la dosis máxima tolerada de cada uno de los agentes respectivos. Por otra parte, no se incrementaron sus efectos secundarios sino que se mantuvieron en un nivel similar.

Tal como se ha expuesto anteriormente, mediante la utilización combinada de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 vez la dosis máxima tolerada de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 vez la dosis máxima tolerada del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, puede obtenerse un efecto anticáncer de modo seguro y suficiente sin incrementar los efectos secundarios de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón y amrubicina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, o en ocasiones reduciendo los efectos secundarios. Por ejemplo, en el caso

de que los efectos secundarios de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón o la amrubicina constituyan un problema, puede aplicarse una dosis más baja comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 vez la dosis máxima tolerada de la amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 vez la dosis máxima tolerada del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón; por otra parte, en el caso de que los efectos secundarios de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón o de la amrubicina no constituyan un problema, puede utilizarse para obtener de modo seguro el máximo efecto anticáncer una dosis más alta comprendida dentro de un intervalo de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 vez la dosis máxima tolerada de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 1 vez la dosis máxima tolerada de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.

En el tratamiento de los cánceres de pulmón humanos, aunque la cantidad puede modificarse convenientemente dependiendo de las condiciones, edad, peso corporal y otros factores del paciente, puede utilizarse en combinación, por ejemplo, entre aproximadamente 60 y aproximadamente 150 mg/m² de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y entre 0,4 y 1,0 veces la dosis máxima tolerada (o dosis máxima administrada) del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón. La amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma pueden administrarse, por ejemplo, en una cantidad de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 150 mg/m² en una sola dosis o en 2 a 5 dosis divididas. El programa preferido para la administración de la amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma incluye, por ejemplo, una sola administración, la administración de una vez al día durante 3 días y similares, e incluye más preferentemente la administración de una vez al día durante 3 días continuos. La dosis para una sola administración incluye, por ejemplo, un intervalo de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 130 mg/m², e incluye preferentemente entre aproximadamente 110 mg/m² y aproximadamente 130 mg/m², y más preferentemente una dosis aproximada de 120 mg/m². La dosis diaria para la administración durante 3 días continuamente incluye, por ejemplo, un intervalo de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 mg/m², preferentemente un intervalo de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 45 mg/m², más preferentemente un intervalo de entre aproximadamente 35 y aproximadamente 45 mg/m², y todavía más preferentemente una dosis aproximada de 40 mg/m², de aproximadamente 45 mg/m² y similares.

La cantidad de administración del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón que debe administrarse en combinación incluye, por ejemplo, un intervalo de entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 1,0 vez de la dosis máxima tolerada o dosis máxima administrada en una única dosis, preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 0,9 veces la dosis máxima tolerada o la dosis máxima administrada en una sola dosis. Por ejemplo es de entre aproximadamente 75 y aproximadamente 135 mg/m² para el irinotecán, entre aproximadamente 12,5 y aproximadamente 22,5 mg/m² para la vinorelbina y entre aproximadamente 500 y aproximadamente 900 mg/m² para la gemcitabina.

Además, el otro medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón puede administrarse en varias dosis divididas, durante un mismo día o durante varios días.

En los pacientes portadores de cáncer de pulmón tratados con el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, en el caso de que se considere que el tratamiento no puede continuarse debido a los efectos secundarios de dicho medicamento, puede continuarse con un tratamiento de efectos secundarios reducidos de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, mediante la administración de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón en una dosis con efectos secundarios reducidos, y la administración adicional de amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La dosis de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón para la reducción de los efectos secundarios incluye, por ejemplo, un intervalo de entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,8 veces la dosis máxima tolerada (o dosis máxima administrada) y preferentemente incluye un intervalo de entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,6 veces la dosis máxima tolerada (o dosis máxima administrada).

En el medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón de la invención, se administra amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma simultáneamente, separadamente o secuencialmente respecto al otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón. Al administrarse separadamente o secuencialmente, la amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede administrarse previamente o administrarse después del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón. El intervalo de ambas administraciones puede fijarse convenientemente y puede ser, por ejemplo, entre 1 y varias horas, entre diez y varias decenas de horas, entre 1 y varios días, 1 semana y similar. Por ejemplo, resulta preferido, para comodidad del paciente, tal como el de visita hospitalaria o similar, que la amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón se administran el mismo día.

Aunque la administración de medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón de la invención varía convenientemente dependiendo del estado, edad y peso corporal del paciente, forma de administración, cantidad administrada del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón que debe administrarse en combinación, frecuencia de administración y similar, resulta preferente que ambas administraciones se repitan tras la administración de la amrubicina anteriormente indicada o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y del otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, a un intervalo de entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 60 días. Más preferentemente, se repiten a un intervalo de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 semanas y todavía más preferentemente a un intervalo de aproximadamente 3 semanas.

ES 2 381 408 T3

La amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma habitualmente puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo mediante inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular; por vía intravesical, intraperitoneal, intrapleural, tópica, rectal, percutánea, nasal y similar). Las vías preferidas se incluyen la inyección intravenosa. Además, la administración oral también resulta posible y entre las formas para la administración oral se incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, polvos, soluciones, jarabes, suspensiones y similares.

El otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón habitualmente puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo mediante inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular; por vía intravesical, intraperitoneal, intrapleural, tópica, rectal, percutánea, nasal y similar). Las vías preferidas incluyen la inyección intravenosa. Además, la administración oral también resulta posible, y entre las formas para la administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, polvos, soluciones, jarabes, suspensiones y similares.

En el medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón de la invención puede administrarse en combinación el otro agente anticáncer, terapia de irradiación, medidas quirúrgicas y similares. Además, puede presentarse en forma de un kit para el medicamento combinado destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, que comprende: (a) una primera composición que comprende amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como principio activo, y (b) una segunda composición que comprende otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón a modo de principio activo.

20 Ejemplos

A continuación, se describe la invención con mayor detalle, haciendo referencia a los Ejemplos, que no son limitativos de la invención.

25 Ejemplo 1

Actividad antitumoral mediante una combinación de hidrocloreto de amrubicina e irinotecán

Se trasplantó por vía subcutánea la cepa celular LX-1 de cáncer de pulmón humano de células pequeñas en ratones desnudos (59 animales) de 6 semanas de edad. Once días después del trasplante tumoral, se asignaron 36 animales que presentaban un volumen tumoral de entre aproximadamente 100 y 300 mm³ a 6 grupos que consistían de 6 animales en cada grupo. El mismo día todos los animales recibieron una administración intravenosa de, respectivamente, tampón de cisteína para el “grupo de vehículo”, la dosis máxima tolerada de hidrocloreto de amrubicina (25 mg/kg) para el “grupo de administración de sólo hidrocloreto de amrubicina”, la dosis máxima tolerada de irinotecán (120 mg/kg) para el “grupo de administración de sólo irinotecán”, 0,5 veces la dosis máxima tolerada de hidrocloreto de amrubicina y 0,5 veces la dosis máxima tolerada de irinotecán para el “grupo de administración combinada (0,5 x MTD)”, 0,8 veces la dosis máxima tolerada de hidrocloreto de amrubicina y 0,8 veces la dosis máxima tolerada de irinotecán para el “grupo de administración combinada (0,8 x MTD)”, la dosis máxima tolerada de hidrocloreto de amrubicina y la dosis máxima tolerada de irinotecán para el “grupo de administración combinada (1 x MTD)”. A continuación, se midieron durante 23 días el volumen tumoral y el peso corporal de los ratones.

Se disolvió hidrocloreto de amrubicina en un tampón de cisteína (que contenía monohidrato de hidrocloreto de L-cisteína 0,4 mg/ml y lactosa 6,25 mg/ml de lactosa), proporcionando una solución de 2,5 mg/ml, que se diluyó con un tampón de cisteína, proporcionando soluciones de 2,0 y 1,25 mg/ml. Cada alícuota de 10 ml/kg de las soluciones se administró como dosis máxima tolerada, la dosis de 0,8 veces o la dosis de 0,5 veces de hidrocloreto de amrubicina.

Se administró el irinotecán proporcionando una alícuota de 120, 96 ó 60 mg/kg de inyección de topotecina (que contenía 20 mg/ml), obtenida de Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., como dosis máxima tolerada, 0,8 veces la dosis o 0,5 veces la dosis de irinotecán.

Las figuras 1 y 2 muestran los cambios del volumen tumoral y peso corporal para el grupo de administración combinada (0,5 x MTD) conjuntamente con datos para la administración de sólo hidrocloreto de amrubicina y aquellos para el grupo de solo administración de irinotecán.

Las figuras 3 y 4 muestran los cambios del volumen tumoral y peso corporal para el grupo de administración combinada (0,8 x MTD) conjuntamente con datos para la grupo de administración independiente de hidrocloreto de amrubicina y aquellos para el grupo de administración independiente de irinotecán.

Las figuras 5 y 6 muestran los cambios del volumen tumoral y peso corporal para el grupo de administración combinada (1 x MTD) conjuntamente con datos para el grupo de administración de sólo hidrocloreto de amrubicina y a los del grupo de administración de irinotecán sólo.

La Tabla 1 muestra el %T/C mínimo de la tasa de crecimiento tumoral en los grupos respectivos. Se calculó el %T/C mínimo del modo siguiente:

%T/C mínimo: el valor mínimo de la proporción (%) entre la tasa de crecimiento tumoral⁵ para los grupos respectivos de administración y la tasa de crecimiento tumoral⁵ para el grupo de administración de vehículo dentro del período de medición.

ES 2 381 408 T3

*)Tasa de crecimiento tumoral: proporción entre un valor medio de volumen tumoral para un grupo de 6 animales en el punto temporal de medición respectivo y un valor medio de volumen tumoral para un grupo de 6 animales en el punto temporal respectivo de administración de fármaco.

5

TABLA 1

10

15

Administración	T/C (%) mínimo - media \pm SD
Hidrocloruro de amrubicina 25 mg/kg	40,79 \pm 5,92
Irinotecán 120 mg/kg	45,61 \pm 12,94
Hidrocloruro de amrubicina 25 mg/kg + Irinotecán 120 mg/kg	24,24 \pm 5,48
Hidrocloruro de amrubicina 20 mg/kg + Irinotecán 96 mg/kg	28,17 \pm 3,85
Hidrocloruro de amrubicina 12,5 mg/kg + Irinotecán 60 mg/kg	45,05 \pm 4,74

1. *Resultados en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD):*

20

Tal como se muestra en la figura 1, el efecto antitumoral en la administración combinada fue similar al observado en los grupos de administración de dosis máxima tolerada de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 40,79% en el grupo de administración de sólo hidrocloruro de amrubicina, 45,61% en el grupo de administración de sólo irinotecán y 45,05% en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD).

25

Los efectos secundarios evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 2, fueron de nivel similar a los observados en el grupo de administración de sólo irinotecán, en comparación con los grupos de administración individual para los agentes individuales respectivos.

30

2. *Resultados en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD):*

35

Tal como se muestra en la figura 3, se produjo una reducción del tumor, y el efecto antitumoral en la administración combinada fue un efecto antitumoral más fuerte que el observado en los grupos de administración individual para los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 40,79% en el grupo de administración de sólo hidrocloruro de amrubicina, de 45,61% en el grupo de administración de sólo irinotecán y de 28,17% en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD).

40

3. *Resultados en el grupo de administración combinada (1 x MTD):*

45

Tal como se muestra en la figura 5, se produjo una reducción del tumor igual que con la administración de 0,8 veces, y el efecto antitumoral de la administración combinada fue más fuerte que el observado en los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 40,79% en el grupo de administración de sólo hidrocloruro de amrubicina, de 45,61% en el grupo de administración de sólo irinotecán y de 24,24% en el grupo de administración combinada (1 x MTD).

50

Respecto a los efectos secundarios, evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 6 se produjo una pérdida transitoria de peso corporal de aproximadamente 3 gramos, aunque este peso se recuperó.

Ejemplo 2

55

Actividad antitumoral de una combinación de hidrocloruro de amrubicina y vinorelbina

60

Se sometió a ensayo la actividad antitumoral mediante una combinación de hidrocloruro de amrubicina y vinorelbina del mismo modo que en el Ejemplo 1, excepto en que se utilizó la cepa celular QC-56, de carcinoma pulmonar de células escamosas humano en lugar de la cepa celular LX-1 de cáncer pulmonar de células pequeñas humano, y que la dosis máxima tolerada de vinorelbina se fijó en 16 mg/kg. La vinorelbina se administró proporcionando una alícuota de 16, 12,8 ó 8 ml/kg de inyección de navelbina (que contenía 10 mg/ml), obtenida de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., como la dosis máxima tolerada, la dosis de 0,8 veces o la dosis de 0,5 veces de vinorelbina. Además, se utilizaron ratones desnudos (100 animales) de 5 semanas de edad.

65

Las figuras 7 y 8 muestran los cambios de volumen tumoral y peso corporal en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD) conjuntamente con los datos del grupo de administración de sólo hidrocloruro de amrubicina y del grupo de administración de sólo vinorelbina.

ES 2 381 408 T3

La figuras 9 y 10 muestran los cambios de volumen tumoral y peso corporal en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD) conjuntamente con los datos del grupo de administración independiente del hidrocloreuro de amrubicina y del grupo de administración independiente de la vinorelbina.

5 Las figuras 11 y 12 muestran los cambios de volumen tumoral y peso corporal en el grupo de administración combinada (1 x MTD) conjuntamente con los datos del grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina y del grupo de administración de sólo vinorelbina.

La Tabla 2 muestra el %T/C mínimo de la tasa de crecimiento tumoral en los grupos respectivos.

TABLA 2

Administración	T/C (%) mínimo - media \pm SD
Hidrocloreuro de amrubicina 25 mg/kg	37,73 \pm 7,56
Vinorelbina 16 mg/kg	38,24 \pm 12,87
Hidrocloreuro de amrubicina 25 mg/kg + Vinorelbina 16 mg/kg	27,15 \pm 8,14
Hidrocloreuro de amrubicina 20 mg/kg + Vinorelbina 12,8 mg/kg	31,10 \pm 13,48
Hidrocloreuro de amrubicina 12,5 mg/kg + Vinorelbina 8 mg/kg	42,43 \pm 20,08

1. Resultados en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD):

Tal como se muestra en la figura 7, el efecto antitumoral de la administración combinada fue un efecto similar al observado en los grupos de administración de la dosis máxima tolerada de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 37,73% en el grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, de 38,24% en el grupo de administración de sólo vinorelbina y de 42,43% en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD).

Para los efectos secundarios evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 8 no se observó un incremento de los efectos secundarios ya que la pérdida de peso corporal fue rara comparado con los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos.

2. Resultados en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD):

Tal como se muestra en la figura 9, se produjo una reducción del tumor y el efecto antitumoral de la administración combinada fue más fuerte que en los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 37,73% en el grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, de 38,24% en el grupo de administración de sólo vinorelbina y de 31,10% en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD).

Los efectos secundarios evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 10, fueron de un nivel similar a los observados en los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos.

3. Resultados en el grupo de administración combinada (1 x MTD):

Tal como se muestra en la figura 11, se produjo una reducción tumoral igual que con la administración de 0,8 veces, y el efecto antitumoral de la administración combinada fue más fuerte que el observado en los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 37,73% en el grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, de 38,24% en el grupo de administración de sólo vinorelbina y de 27,15% en el grupo de administración combinada (1 x MTD).

Respecto a los efectos secundarios, evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 12 se produjo una pérdida transitoria de peso corporal de aproximadamente 1,4 gramos, aunque este peso se recuperó.

Ejemplo 3

Actividad antitumoral de una combinación de hidrocloreuro de amrubicina y gemcitabina

Se sometió a ensayo la actividad antitumoral de una combinación de hidrocloreuro de amrubicina y gemcitabina de la misma manera que en el Ejemplo 2, excepto en que se fijó la dosis máxima tolerada de la gemcitabina en 300 mg/kg/día y la administración se realizó por vía intraperitoneal una vez a la semana en dos ciclos. La gemcitabina se administró mediante una alícuota de 300, 240 ó 150 ml/kg en una inyección Gemzar (que contenía 200 mg/vial),

ES 2 381 408 T3

obtenida de Eli Lilly Japan K.K., como dosis máxima tolerada, la dosis de 0,8 veces o la dosis de 0,5 veces de gemcitabina. Además, se utilizaron ratones desnudos (80 animales) de 5 semanas de edad.

Las figuras 13 y 14 muestran los cambios de volumen tumoral y peso corporal en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD) conjuntamente con los datos del grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina y del grupo de administración de sólo gemcitabina.

Las figuras 15 y 16 muestran los cambios de volumen tumoral y peso corporal en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD) conjuntamente con los datos del grupo de administración independiente de hidroclicloruro de amrubicina y del grupo de administración independiente de gemcitabina.

Las figuras 17 y 18 muestran los cambios de volumen tumoral y peso corporal en el grupo de administración combinada (1 x MTD) conjuntamente con los datos del grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina y del grupo de administración de sólo gemcitabina.

La Tabla 3 muestra el %T/C mínimo de la tasa de crecimiento tumoral en los grupos respectivos.

TABLA 3

Administración	T/C (%) mínimo Media \pm SD
Hidroclicloruro de amrubicina 25 mg/kg	51,06 \pm 16,56
Gemcitabina 300 mg/kg, i.p. 2q7d	69,47 \pm 26,06
Hidroclicloruro de amrubicina 25 mg/kg + Gemcitabina 300 mg/kg	41,33 \pm 15,12
Hidroclicloruro de amrubicina 20 mg/kg + Gemcitabina 240 mg/kg	34,27 \pm 14,05
Hidroclicloruro de amrubicina 12,5 mg/kg + Gemcitabina 150 mg/kg	56,67 \pm 18,87

1. Resultados en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD):

Tal como se muestra en la figura 13, el efecto antitumoral en la administración combinada fue similar en los grupos de administración de dosis máxima tolerada de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 51,06% en el grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, de 69,47% en el grupo de administración de sólo gemcitabina y de 56,67% en el grupo de administración combinada (0,5 x MTD).

Respecto a los efectos secundarios, evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 14 se observó un efecto reductor notable de los efectos secundarios, posiblemente provocados por la reducción a la mitad de la dosis de gemcitabina, en comparación con los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos.

2. Resultados en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD):

Tal como se muestra en la figura 15, se produjo una reducción tumoral y el efecto antitumoral de la administración combinada fue más fuerte que en los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 51,06% en el grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, de 69,47% en el grupo de administración de sólo gemcitabina y de 34,27% en el grupo de administración combinada (0,8 x MTD).

Los efectos secundarios, evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 16 fue de un nivel similar al observado en el grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina.

3. Resultados en el grupo de administración combinada (1 x MTD):

Tal como se muestra en la figura 17, se produjo una reducción tumoral igual que con la administración de 0,8 veces, y el efecto antitumoral de la administración combinada fue más fuerte que en los grupos de administración individual de los agentes individuales respectivos. De esta manera, el %T/C mínimo fue de 51,06% en el grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, de 69,47% en el grupo de administración de sólo gemcitabina y de 41,33% en el grupo de administración combinada (1 x MTD).

Los efectos secundarios, evaluados a partir de la pérdida de peso corporal de los animales, tal como se muestra en la figura 18 fueron de un nivel similar a los observados en el grupo de administración de sólo gemcitabina.

Tal como se ha indicado en los Ejemplos 1 a 3 anteriores, los efectos secundarios fueron reducidos y se observaron efectos terapéuticos notables con la administración combinada de hidroclicloruro de amrubicina con irinotecán, vino-

ES 2 381 408 T3

relbina y gemcitabina. Además, tal como puede entenderse a partir de las figuras 1 a 18, los efectos de la utilización combinada aparecen con significancia particular a las 2 semanas de la administración y los efectos prácticamente desaparecen tras 3 semanas. En consecuencia, resulta preferido que la administración se repita tras un período de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 semanas, y particularmente la administración repetida se lleva a cabo tras aproximadamente 3 semanas y es continuada posteriormente.

Ejemplo 4

Efectos de la combinación in vitro de hidrocloreuro de amrubicinol con irinotecán

Se examinaron los efectos de la combinación *in vitro* de hidrocloreuro de amrubicinol e hidrocloreuro de irinotecán mediante la utilización de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano.

Se obtuvo la cepa celular A549 de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano de la ATCC (American Type Culture Collection). En un medio que comprendía D-MEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) y suero de feto bovino (FCS) al 10% se subcultivó la cepa celular A549 de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano. El cultivo se llevó a cabo en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C. También se utilizó el mismo medio en los experimentos siguientes.

Los agentes de ensayo se prepararon tal como se expone a continuación.

Se obtuvo hidrocloreuro de irinotecán de Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., y se proporcionó tras realizar diluciones en serie de 2 veces con el medio utilizado.

Se preparó el amrubicinol mediante un método descrito en la literatura (Ishizumi *et al.*, J. Org. Chem. 52:4477-4485, 1987). Se prepararon alícuotas de aproximadamente 1 mg de hidrocloreuro de amrubicinol conservado en un ultracongelador (-80°C), se reservaron en un congelador (-20°C) y seguidamente se disolvieron en agua destilada para proporcionar 1 mg/ml para ser utilizadas tras la esterilización mediante filtración, seguido de la dilución en serie de 2 veces con el medio.

La cepa celular A549 de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano subcultivada se sometió a un tratamiento de tripsina, se suspendió en el medio y se sembró en una placa de 96 pocillos. Se fijó la densidad de siembra en 5x10² células/0,1 ml/pocillo. Tras la siembra, las células se cultivaron durante la noche en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C (día 0).

Al grupo de evaluación de agente individual se le añadieron 0,05 ml/pocillo de una solución diluida de un agente de ensayo y 0,05 ml/pocillo de medio, y al grupo de evaluación del efecto de la combinación se añadieron 0,05 ml/pocillo de una solución diluida de hidrocloreuro de amrubicinol y una solución diluida de 0,05 ml/pocillo de hidrocloreuro de irinotecán (día 1). Los experimentos se llevaron a cabo en n=3 en el grupo tratado con agente y en n=6 en el grupo no tratado (de control).

Hasta el día 4 el cultivo se llevó a cabo en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C.

El día 4, se añadieron a cada uno de los pocillos 0,02 ml de solución WST (una solución que contenía 1,3 mg/ml de WST-1 (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal sódica) y 0,14 mg/ml de 1-metoxi PMS (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio) en una solución de tampón fosfato (PBS)). A continuación, se llevó a cabo el cultivo en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C durante 2 a 4 horas. A continuación se midió la absorbancia del cultivo con un lector de microplacas modelo 3550-UV (BioRad) y se estimó el número de células vivas.

Se determinó la tasa de crecimiento *f* mediante la fórmula siguiente:

$$f = \frac{\text{(valor medio de absorbancia a cada una de las concentraciones de agente)}}{\text{(valor medio de absorbancia a la concentración de agente de 0 mg/ml)}}$$

Absorbancia: A₄₂₀ - A₆₃₀.

Se representó gráficamente log((1/f) - 1) frente a log(concentración de agente) y a continuación se dibujó una línea de regresión según el método de cuadrados mínimos con el fin de encontrar la pendiente *m* y el corte con el eje X. Exp(valor de corte con X) representa el valor de IC₅₀ (concentración de agente necesaria para una inhibición de 50% del crecimiento celular). Aunque la proporción de concentraciones de hidrocloreuro de amrubicinol e hidrocloreuro de irinotecán es de 1:25, se obtuvieron los valores de *m* e IC₅₀, respectivamente (en lo sucesivo, el valor de IC₅₀ se representa como D_{*m*}, y el hidrocloreuro de amrubicinol se representa con el subíndice 1, mientras que el hidrocloreuro de irinotecán se representa con el subíndice 2, por ejemplo D_{*m*1}).

Se determinó la concentración *D* de hidrocloreuro de amrubicinol y de hidrocloreuro de irinotecán para conseguir una tasa de inhibición particular del crecimiento (*f*_{*a*}) mediante la fórmula (1). Se define la concentración de agente individual como D_{*f*1} y D_{*f*2}, mientras que la concentración utilizada en combinación se define como D_{*x*1} y D_{*x*2}, y de

ES 2 381 408 T3

esta manera se calculó un índice de combinación (IC) mediante la fórmula (2) (M. Pegram *et al.*, Oncogene 18:2241 - 2251, 1999).

$$D = D_m \times \{fa/(1-fa)\}^{1/m} \quad \dots (1)$$

$$IC = Dx_1/Df_1 + Dx_2/Df_2 + (Dx_1 \times Dx_2)/(Df_1 \times Df_2) \quad \dots (2)$$

Se realizó una evaluación como efecto aditivo en IC=1, como efecto sinérgico en IC<1 y como efecto antagonista en IC>1.

La figura 19 muestra los efectos *in vitro* de la combinación de hidrocloreto de amrubicinol e hidrocloreto de irinotecán, en la que un eje horizontal representa una tasa de inhibición del crecimiento *fa* y un eje vertical representa el índice de combinación (IC). Tal como se muestra en la figura 19, el índice de combinación (IC) indicaba un valor más bajo de 1 en el intervalo de *fa*=0,1 a 0,9. De esta manera, en la combinación de hidrocloreto de amrubicinol con hidrocloreto de irinotecán, se reveló un efecto de sinergia elevado según la determinación del efecto de combinación con IC.

Ejemplo 5

Análisis de fluctuaciones de la expresión del gen de la carbonilreductasa en tejidos normales y tumorales

Se llevó a cabo un análisis de chips de ADN utilizando ARN totales preparados con 69 muestras de tejido pulmonar humano normal y 44 muestras de adenocarcinoma pulmonar, 32 muestras de carcinoma pulmonar de células escamosas, 5 muestras de carcinoma pulmonar de células grandes y 18 muestras de células leucémicas. El análisis de chips de ADN se llevó a cabo con el chip génico del genoma humano U95A, B, C, D y E de Affymetrix. Concretamente, el análisis se llevó a cabo siguiendo un procedimiento que consistía en: (1) la preparación de un ADNc a partir de un ARN total, (2) la preparación de un ARNc marcado a partir de dicho ADNc, (3) la fragmentación del ARNc marcado, (4) la hibridación del ARNc fragmentado con un panel de sondas, (5) la tinción del panel de sondas, (6) el barrido del panel de sondas, y (7) el análisis de la expresión génica.

(1) Preparación de un ADNc a partir de un ARN total

Cada una de las soluciones mixtas de 11 μ l que contenían 10 μ g de cada uno de los ARN totales preparados con 69 muestras de tejido pulmonar humano normal, con 44 muestras de adenocarcinoma pulmonar, con 32 muestras de carcinoma pulmonar de células escamosas, con 5 muestras de carcinoma pulmonar de células grandes y con 18 muestras de células de leucemia, y 100 pmoles de cebador de T7-(dT)24 (fabricado por Amersham) se calentaron a 70°C durante 10 minutos y se enfriaron en hielo. Tras enfriar, se añadieron 4 μ l de 5 x tampón de primera cadena de ADNc contenido en el sistema SuperScript Choice para la síntesis de ADNc (fabricado por Gibco-BRL), 2 μ l de DTT (ditiotreitol) 0,1 M contenido en dicho kit y 1 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, y la mezcla se calentó a 42°C durante 2 minutos. Además, se añadieron 2 μ l (400 U) de SuperScript II RT contenido en dicho kit. La mezcla se calentó a 42°C durante 1 hora y se enfrió en hielo. Tras enfriar, se añadieron 91 μ l de agua tratada con DEPC (fabricada por Nacalai Tesque, Inc.), 30 μ l de 5 x tampón de reacción de segunda cadena contenido en dicho kit, 3 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM, 1 μ l (10 U) de ADN ligasa de *E. coli* contenida en dicho kit, 4 μ l (40 U) de ADN polimerasa de *E. coli* contenida en dicho kit y 1 μ l (2 U) de ARNasa H de *E. coli* contenida en dicho kit y se hicieron reaccionar a 16°C durante 2 horas. A continuación, tras añadir 2 μ l (10 U) de ADN polimerasa de T4 contenida en dicho kit y hacer reaccionar a 16°C durante 5 minutos, se añadieron 10 μ l de EDTA 0,5 M. A continuación, se añadieron 162 μ l de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (fabricada por Nippongene) y se mezclaron. La solución mezclada se transfirió a Phase Lock Gel Light (fabricados por Eppendorf), que había sido centrifugado previamente a temperatura ambiente y a 14.000 rpm durante 30 segundos, se centrifugó a temperatura ambiente y a 14.000 rpm durante 2 minutos y se transfirieron 145 μ l de capa acuosa a un tubo Eppendorf. A la solución obtenida se le añadieron 72,5 μ l de solución de acetato amónico 7,5 M y 362,5 μ l de etanol, y tras mezclar, la mezcla se centrifugó a 4°C y a 14.000 rpm durante 20 minutos. Tras centrifugar, se descartó el sobrenadante, proporcionando un sedimento de ADN que contenía el ADNc preparado. A continuación, se añadieron 0,5 ml de etanol al 80% a dicho sedimento y la mezcla se centrifugó a 4°C y a 14.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Tras repetir el mismo tratamiento, se secó el sedimento y se disolvió en 12 μ l de agua tratada con DEPC.

Mediante el procedimiento indicado anteriormente se obtuvieron ADNc a partir de los ARN totales derivados de 69 muestras de tejido pulmonar humano normal, y de 44 muestras de adenocarcinoma pulmonar, 32 muestras de carcinoma pulmonar de células escamosas, 5 muestras de carcinoma pulmonar de células grandes y 18 muestras de células de leucemia.

(2) Preparación de un ARNc marcado a partir de dicho ADNc

En 5 μ l de cada una de las soluciones de ADNc preparadas en (1), anteriormente, se mezclaron 17 μ l de agua tratada con DEPC, 4 μ l de 10 x tampón de reacción HY contenido en el kit de mareaje de alto rendimiento de transcritos de ARN BioArray (fabricado por Enzo), 4 μ l de 10 x ribonucleótidos marcados con biotina contenidos en dicho kit, 4 μ l

ES 2 381 408 T3

de 10 x DTT contenido en dicho kit, 4 μ l de 10 x mezcla de inhibidor de ARNasa contenido en dicho kit y 2 μ l de 20 x ARN polimerasa de T7 contenida en dicho kit, y se hicieron reaccionar a 37°C durante 5 horas. Tras la reacción, se añadieron 60 μ l de agua tratada con DEPC a la solución de reacción y los ARNc marcados que se habían preparado se purificaron con el kit RNeasy Mini según el protocolo adjunto.

(3) Fragmentación del ARNc marcado

A una solución que contenía 20 μ g de cada uno de los ARNc marcados purificados en (3), anteriormente, se le añadieron 8 μ l de 5 x tampón de fragmentación (Tris-acetato 200 mM, pH 8,1 (fabricado por Sigma), acetato potásico 500 mM (fabricado por Sigma) y acetato de magnesio 150 mM (fabricado por Sigma)). Tras calentar 40 μ l de la solución de reacción obtenida a 94°C durante 35 minutos, la solución se dejó en hielo. Esto permitió la fragmentación de los ARNc marcados.

(4) Hibridación del ARNc fragmentado con un panel de sondas

A 40 μ l de cada uno de los ARNc fragmentados que se han obtenido en (3), anteriormente, se le añadieron 4 μ l de oligo B2 de control 5 nM (fabricado por Amersham), 4 μ l de 100 x cóctel de ARNc de control, 40 μ g de ADN de esperma de arenque (fabricado por Promega), 200 μ g de BSA acetilado (fabricado por Gibco-BRL), 200 μ l de 2 x tampón de hibridación MES (MES 200 mM, [Na⁺] 2 M, EDTA 40 mM, Tween 20 al 0,02% (fabricado por Pierce), pH 6,5 a 7,5) y 144 μ l de agua tratada con DEPC, proporcionando 400 μ l de cóctel hibridado. Cada uno de los cócteles hibridados que se obtuvieron se calentaron a 99°C durante 5 minutos y adicionalmente a 45°C durante 5 minutos. Tras el calentamiento, el cóctel se centrifugó a temperatura ambiente y a 14.000 rpm durante 5 minutos, proporcionando un sobrenadante del cóctel hibridado.

Por otra parte, tras hacer girar el panel de sondas genómicas U95 humanas (fabricado por Affymetrix) relleno con 1 x tampón de hibridación MES en un horno de hibridación a 45°C y a 60 rpm durante 10 minutos, se eliminó 1 x tampón de hibridación MES, proporcionando un panel de sondas. Al panel de sondas se añadieron 200 μ l del sobrenadante del cóctel hibridado obtenido anteriormente y la mezcla se hizo girar en un horno de hibridación a 45°C y a 60 rpm durante 16 horas, proporcionando un panel de sondas hibridadas con el ARNc fragmentado.

(5) Tinción del panel de sondas

Tras recoger y eliminar el cóctel hibridado de la matriz de sondas ya hibridada que se había obtenido en (4), anteriormente, el producto se rellenó con tampón de lavado no restrictivo (6 x SSPE (preparado mediante dilución 20 x SSPE (fabricado por Nacalai Tesque)), Tween 20 al 0,01% y antiespumante 0-30 al 0,005% (fabricado por Sigma)). A continuación, el ARNc fragmentado y el panel de sondas hibridadas se introdujo en posiciones respectivas de la estación de fluidos GeneChip Fluidics Station 400 (fabricada por Affymetrix) preparada con tampón de lavado no restrictivo y tampón de lavado restrictivo (MES 100 mM, NaCl 0,1 M y Tween 20 al 0,01%). A continuación, según el protocolo de tinción EuKGE-WS2, se llevó a cabo la tinción con una primera solución de tinción (estreptavidina 10 μ g/ml, ficoeritrina (SAP) (fabricado por Molecular Probes), BSA acetilado 2 mg/ml, MES 100 mM, NaCl 1 M (fabricado por Ambion), Tween 20 al 0,05% y antiespumante 0-30 al 0,005%) y una segunda solución de tinción (IgG de cabra 100 μ g/ml (fabricado por Sigma), anticuerpo antiestreptavidina biotinilado 3 μ g/ml (fabricado por Vector Laboratories), BSA acetilado 2 mg/ml, MES 100 mM, NaCl 1 M, Tween 20 al 0,05% y antiespumante 0-30 al 0,005%).

(6) Barrido del panel de sondas, y (7) Análisis de la expresión génica

Cada uno de los paneles de sondas teñidos en (5), anteriormente, se sometió a un barrido con el HPGeneArrayScanner (fabricado por Affymetrix) para leer el patrón de tinción.

La expresión del gen carbonilreductasa 1 en el panel de sondas se analizó con el sistema GeneChip Workstation (fabricado por Affymetrix) basándose en el patrón de tinción.

A continuación, se llevaron a cabo la normalización y el análisis comparativo de la expresión génica según el protocolo de análisis.

Como resultado, en las células de leucemia humanas, se encontró que la frecuencia de expresión de la carbonilreductasa 1 era de 11% (2 casos de entre 18) y la mediana del nivel de expresión era de -39, indicando que el gen apenas se expresaba. Por otra parte, en tejidos pulmonares humanos, se encontró que la frecuencia de expresión de la carbonilreductasa 1 era de 55% (24 casos de entre 44), de 63% (20 casos de entre 32), de 40% (2 casos de entre 5) y de 32% (22 casos de entre 69) en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y tejido normal, respectivamente, y los niveles de expresión eran de 51, 96, 34 y 22, respectivamente, indicando que la expresión de la carbonilreductasa 1 se encontraba incrementada en los tejidos de cáncer de pulmón en comparación con el tejido pulmonar normal y, en particular, los niveles de expresión en adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de células escamosas eran más de 2 y 4 veces superiores que en el tejido pulmonar normal, respectivamente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de cáncer pulmonar de células pequeñas al administrar en combinación 0,5 veces la dosis máxima tolerada (MTD) de hidroclicloruro de amrubicina y 0,5 veces la dosis máxima tolerada de irinotecán. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo irinotecán y ♦ indica un grupo de administración combinada.

La figura 2 muestra un efecto reductor del peso corporal como un efecto secundario cuando son utilizadas en combinación 0,5 veces la dosis tolerada máxima de hidroclicloruro de amrubicina y 0,5 veces la dosis tolerada máxima de irinotecán. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo irinotecán y ♦ indica un grupo de administración combinada.

La figura 3 muestra un efecto inhibitorio del crecimiento de las células del cáncer de pulmón de células pequeñas cuando son utilizadas en combinación 0,8 veces de la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 0,8 veces de la dosis tolerada máxima de irinotecán. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo irinotecán y ♦ indica un grupo de administración combinada.

La figura 4 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 0,8 veces la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 0,8 veces la dosis máxima tolerada de irinotecán. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo irinotecán y ♦ indica un grupo de administración combinada.

La figura 5 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de cáncer de pulmón de células pequeñas al administrar en combinación 1,0 vez la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 1,0 vez la dosis máxima tolerada de irinotecán. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo irinotecán y ● indica un grupo de administración combinada.

La figura 6 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 1,0 vez la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 1,0 vez la dosis máxima tolerada de irinotecán. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo irinotecán y ● indica un grupo de administración combinada.

La figura 7 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de células de carcinoma pulmonar de células escamosas al administrar en combinación 0,5 veces la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 0,5 veces la dosis máxima tolerada de vinorelbina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo vinorelbina y ▲ indica un grupo de administración combinada.

La figura 8 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 0,5 veces la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 0,5 veces la dosis máxima tolerada de vinorelbina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo vinorelbina y ▲ indica un grupo de administración combinada.

La figura 9 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de carcinoma pulmonar de células escamosas al administrar en combinación 0,8 veces la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 0,8 veces la dosis máxima tolerada de vinorelbina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo vinorelbina y ♦ indica un grupo de administración combinada.

La figura 10 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 0,8 veces la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 0,8 veces la dosis máxima tolerada de vinorelbina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo vinorelbina y ♦ indica un grupo de administración combinada.

La figura 11 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de carcinoma pulmonar de células escamosas al administrar en combinación 1,0 vez la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 1,0 vez la dosis máxima tolerada de vinorelbina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo vinorelbina y ● indica un grupo de administración combinada.

La figura 12 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 1,0 vez la dosis máxima tolerada de hidroclicloruro de amrubicina y 1,0 vez la dosis máxima tolerada de vinorelbina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidroclicloruro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo vinorelbina y ● indica un grupo de administración combinada.

ES 2 381 408 T3

5 La figura 13 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de carcinoma pulmonar de células escamosas al administrar en combinación 0,5 veces la dosis máxima tolerada de hidrocloreuro de amrubicina y 0,5 veces la dosis máxima tolerada de gemcitabina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo gemcitabina y ▲ indica un grupo de administración combinada.

10 La figura 14 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 0,5 veces la dosis máxima tolerada de hidrocloreuro de amrubicina y 0,5 veces la dosis máxima tolerada de gemcitabina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo gemcitabina y ▲ indica un grupo de administración combinada.

15 La figura 15 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de carcinoma pulmonar de células escamosas al administrar en combinación 0,8 veces la dosis máxima tolerada de hidrocloreuro de amrubicina y 0,8 veces la dosis máxima tolerada de gemcitabina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo gemcitabina y ◆ indica un grupo de administración combinada.

20 La figura 16 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 0,8 veces la dosis máxima tolerada de hidrocloreuro de amrubicina y 0,8 veces la dosis máxima tolerada de gemcitabina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo gemcitabina y ◆ indica un grupo de administración combinada.

25 La figura 17 muestra un efecto de inhibición del crecimiento de las células de carcinoma pulmonar de células escamosas al administrar en combinación 1,0 vez la dosis máxima tolerada de hidrocloreuro de amrubicina y 1,0 vez la dosis máxima tolerada de gemcitabina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo gemcitabina y ● indica un grupo de administración combinada.

30 La figura 18 muestra un efecto de reducción del peso corporal como efecto secundario al administrar en combinación 1,0 vez la dosis máxima tolerada de hidrocloreuro de amrubicina y 1,0 vez la dosis máxima tolerada de gemcitabina. La línea indica un grupo de vehículo, □ indica un grupo de administración de sólo hidrocloreuro de amrubicina, Δ indica un grupo de administración de sólo gemcitabina y ● indica un grupo de administración combinada.

35 La figura 19 muestra los efectos *in vitro* de la combinación de hidrocloreuro de amrubicinol e irinotecán. Se representan valores de IC de 0,1 a 0,9 frente al valor de fa, que es una tasa de inhibición del crecimiento, en el eje horizontal, e IC (índice de combinación) en el eje vertical.

Aplicabilidad industrial

40 Según la invención, está previsto un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón que es una combinación de hidrocloreuro de amrubicina y otro medicamento, la cual resulta útil en el tratamiento de un sujeto con cáncer de pulmón. Mediante la utilización combinada con el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón puede mejorarse el efecto terapéutico antitumoral del hidrocloreuro de amrubicina y resulta posible la terapia del cáncer con efectos secundarios reducidos de dicho medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, para la utilización en combinación con otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón, en la que el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón es el irinotecán, la vinorelbina o la gemcitabina.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el cáncer de pulmón es el cáncer de pulmón de células pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar de células escamosas o el carcinoma pulmonar de células grandes.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el cáncer de pulmón es el cáncer de pulmón de células pequeñas o el carcinoma pulmonar de células escamosas.
- 20 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la amrubicina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el hidrócloruro de amrubicina.
- 25 5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento que se administra simultánea, separada del o secuencialmente con el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.
- 30 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de un medicamento para un paciente portador de un cáncer de pulmón en el que se administra o está previsto administrar el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón.
- 35 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la preparación de un medicamento que es envasado de manera que aproximadamente 60 a aproximadamente 150 mg/m² de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma son administrados en una única dosis o en 2 a 5 dosis divididas.
- 40 8. Utilización según la reivindicación 7, para la preparación de un medicamento que es envasado de manera que son administrados en una única dosis aproximadamente 80 a aproximadamente 130 mg/m², preferentemente aproximadamente 110 a aproximadamente 130 mg/m² de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 45 9. Utilización según la reivindicación 7, para la preparación de un medicamento que es envasado de manera que son administrados una vez al día durante 3 días aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/m², preferentemente aproximadamente 30 a aproximadamente 45 mg/m², más preferentemente aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mg/m² de amrubicina o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 50 10. Utilización según la reivindicación 9, en la que la amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es administrada durante 3 días continuos.
- 55 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón es administrado en una utilización combinada de aproximadamente 0,4 veces a aproximadamente 1,0 vez la dosis máxima tolerada o aproximadamente 0,4 veces a aproximadamente 1,0 vez la dosis máxima administrada.
- 60 12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de un medicamento destinado a un paciente que presenta un cáncer de pulmón, en la que el paciente no continúa recibiendo el tratamiento con el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón debido a los efectos secundarios, y en la que el paciente recibe la administración de dicho otro medicamento en una cantidad que provocará unos efectos secundarios reducidos.
- 65 13. Producto que comprende amrubicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón para la utilización simultánea, separada o secuencial en el tratamiento del cáncer de pulmón, en el que el otro medicamento destinado al tratamiento del cáncer de pulmón es el irinotecán, la vinorelbina o la gemcitabina.
- 65 14. Producto destinado al tratamiento del cáncer de pulmón según la reivindicación 13, en el que la amrubicina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma es el hidrócloruro de amrubicina.

Fig. 1

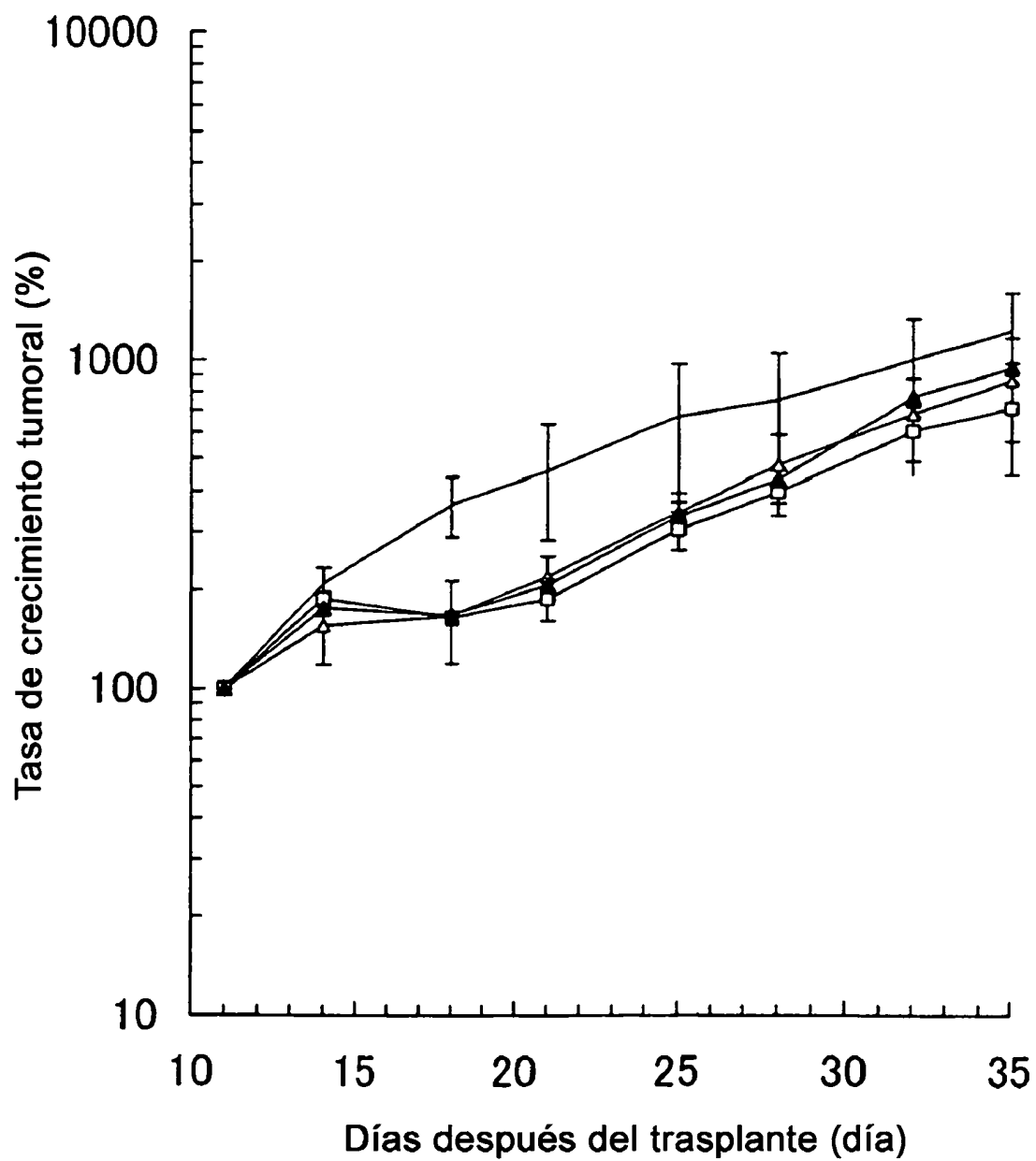


Fig. 2

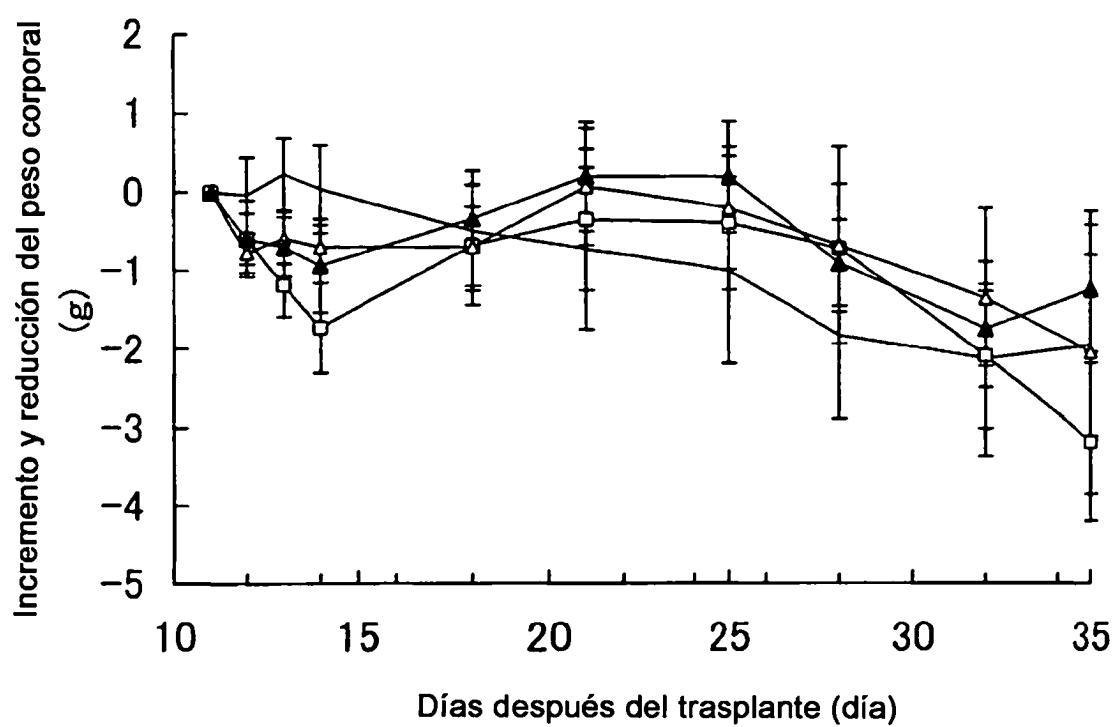


Fig. 3

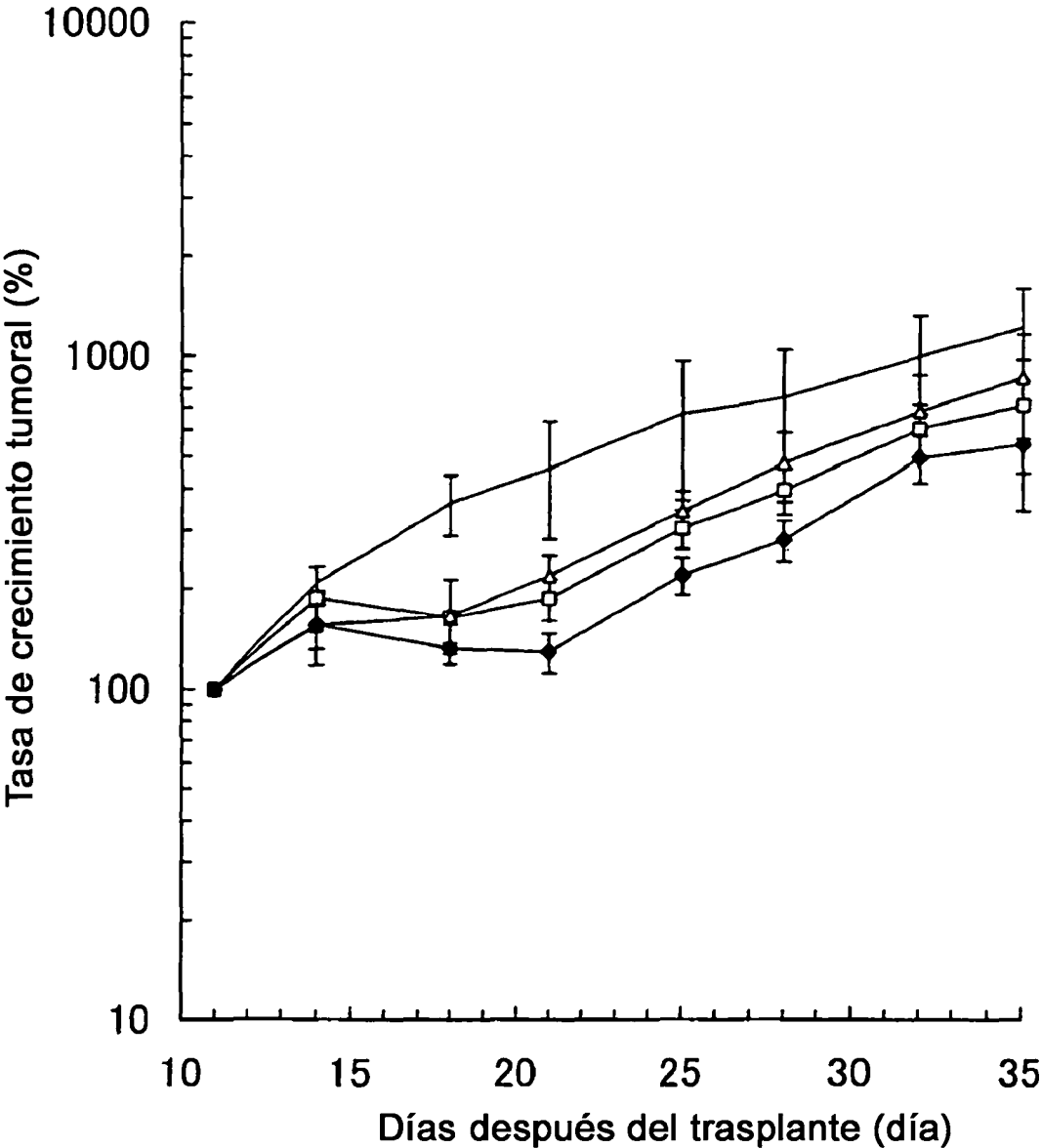


Fig. 4

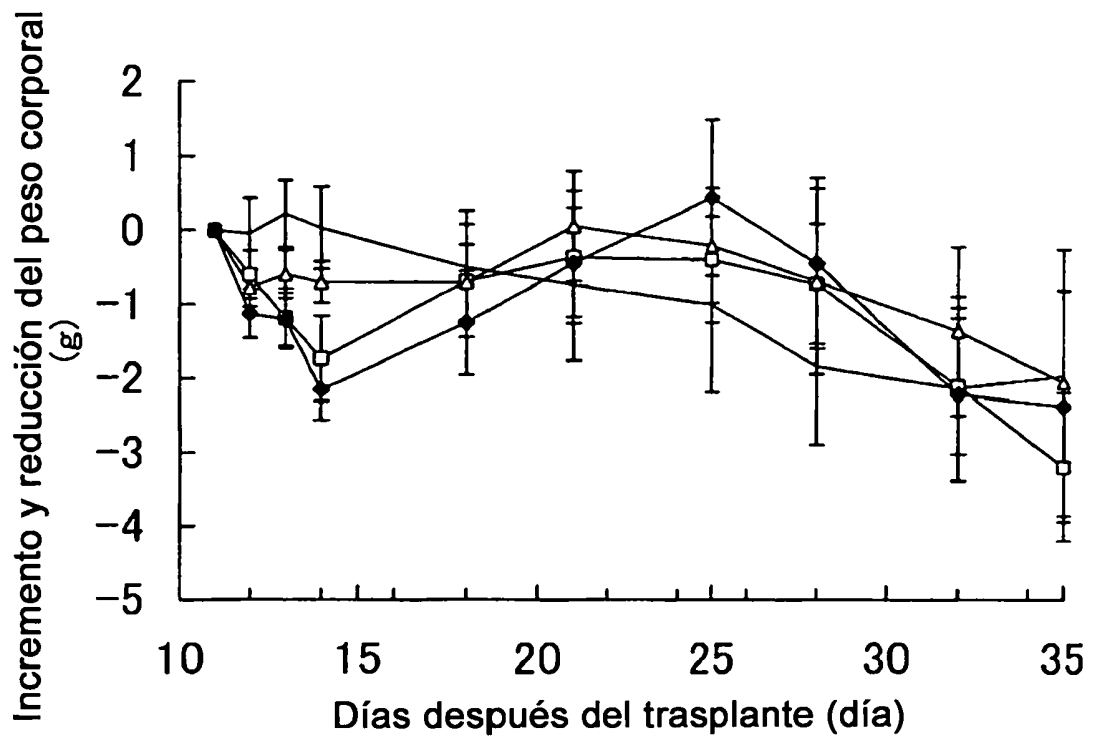


Fig. 5

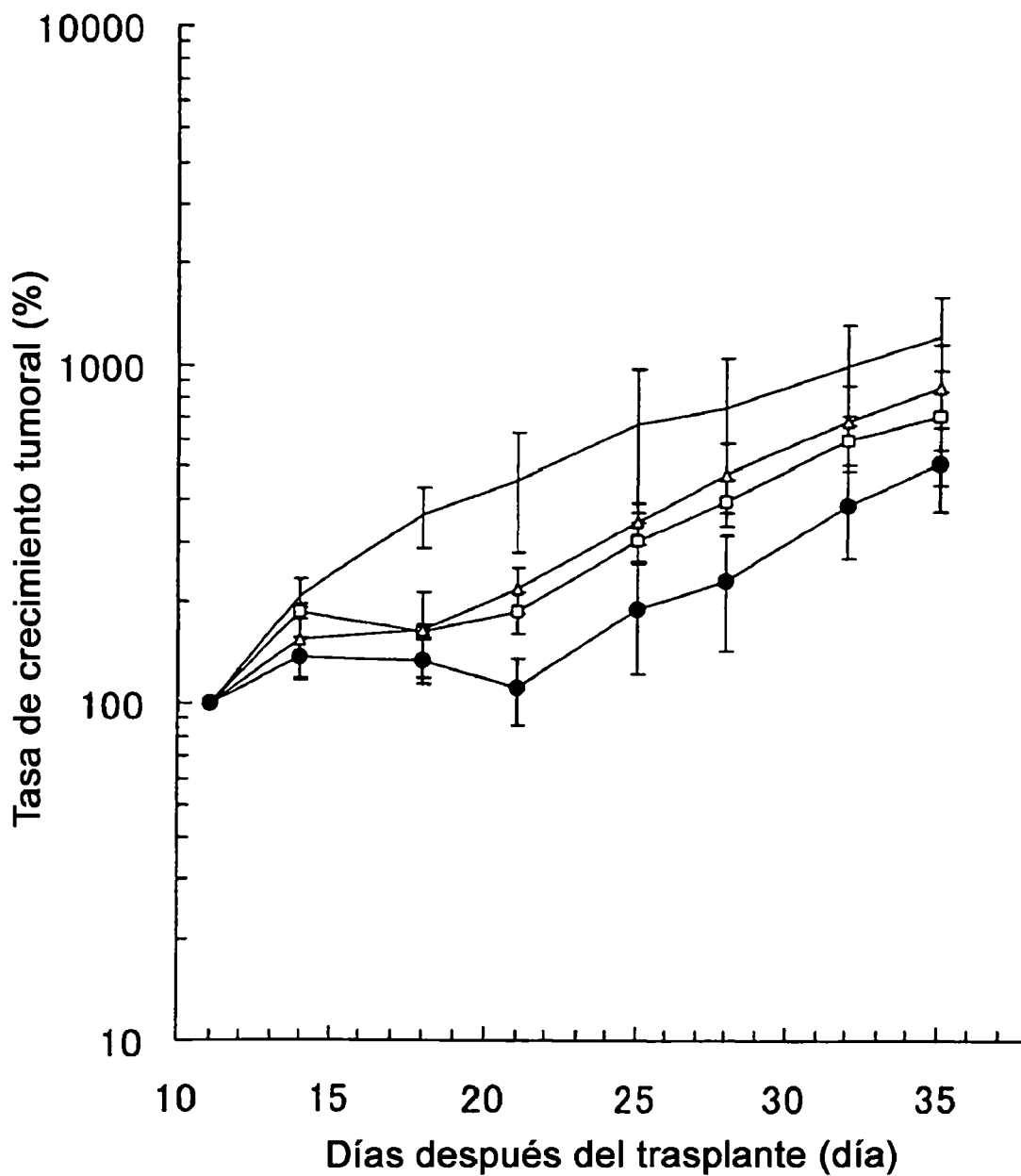


Fig. 6

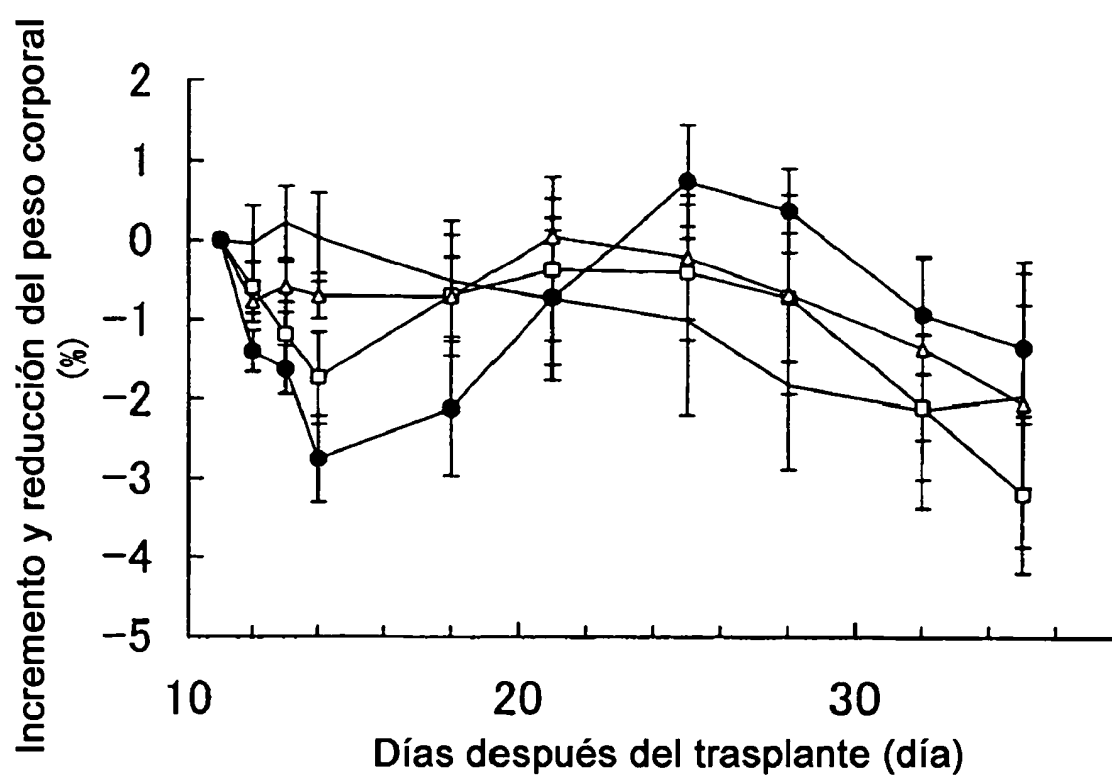


Fig. 7

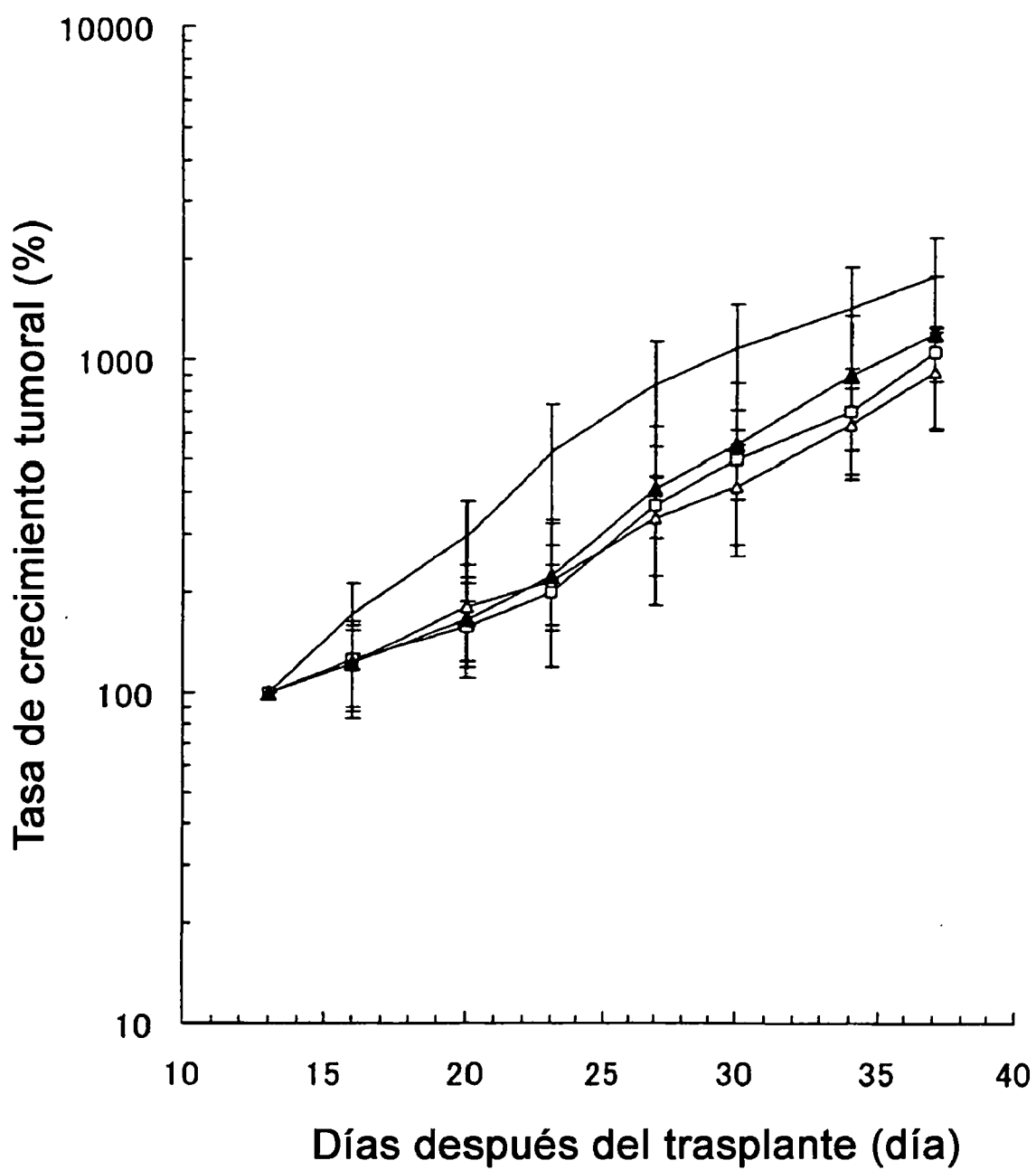


Fig. 8

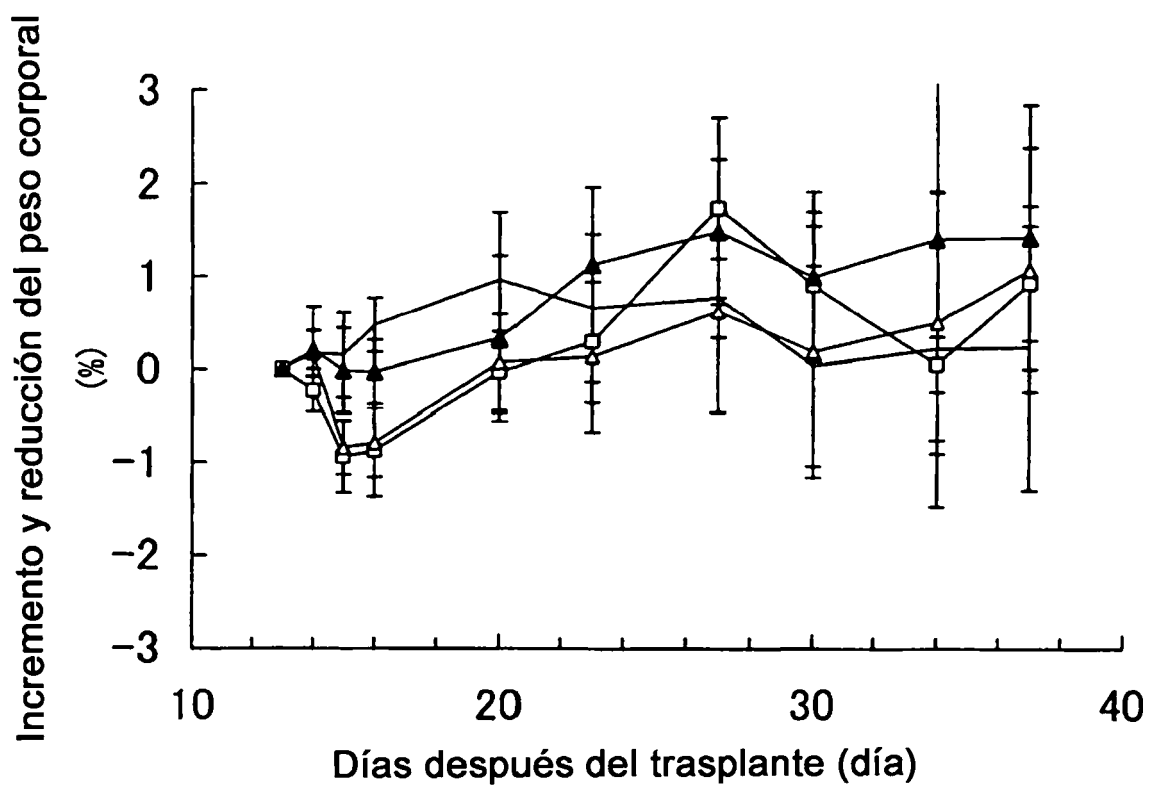


Fig. 9

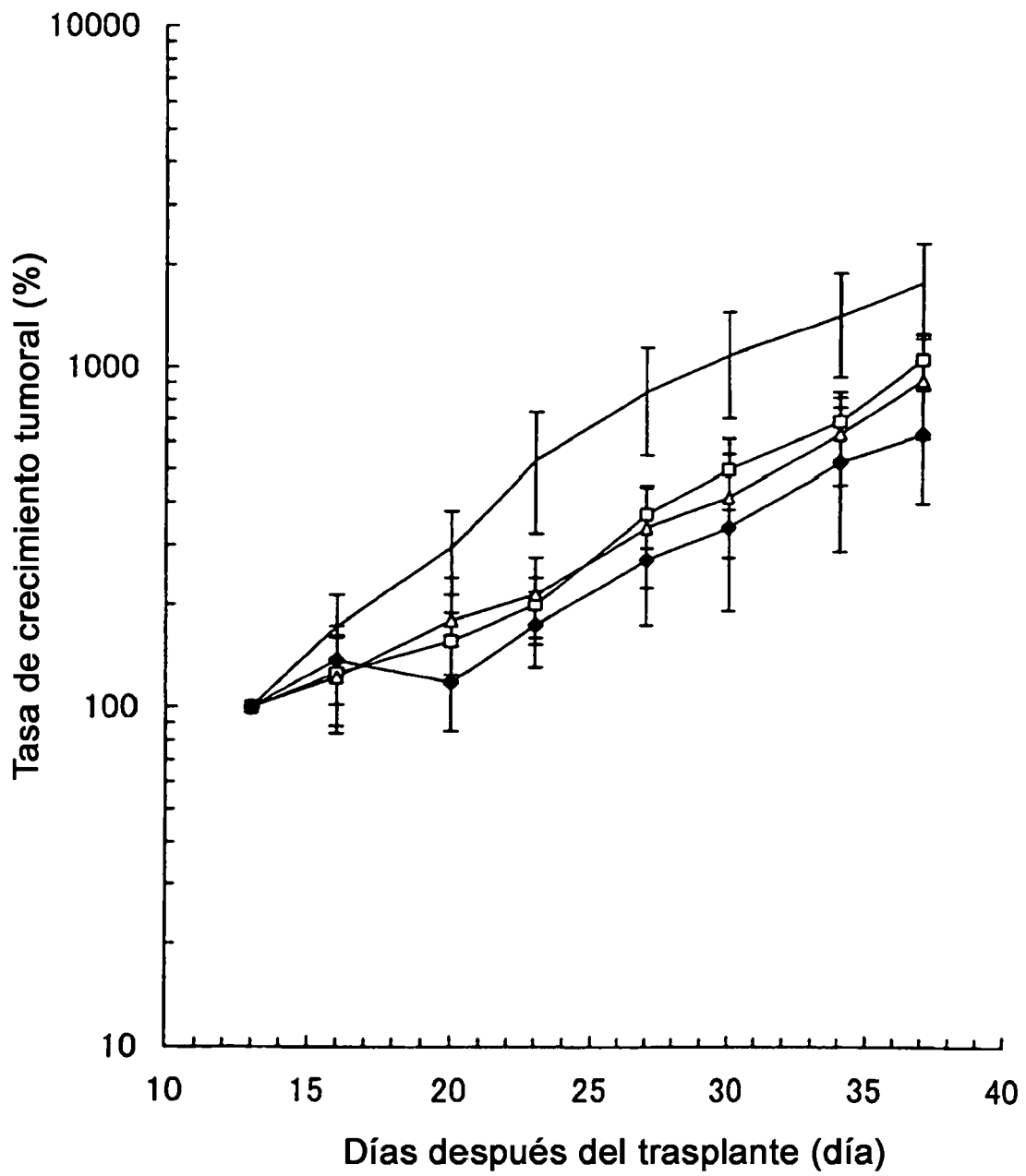


Fig. 10

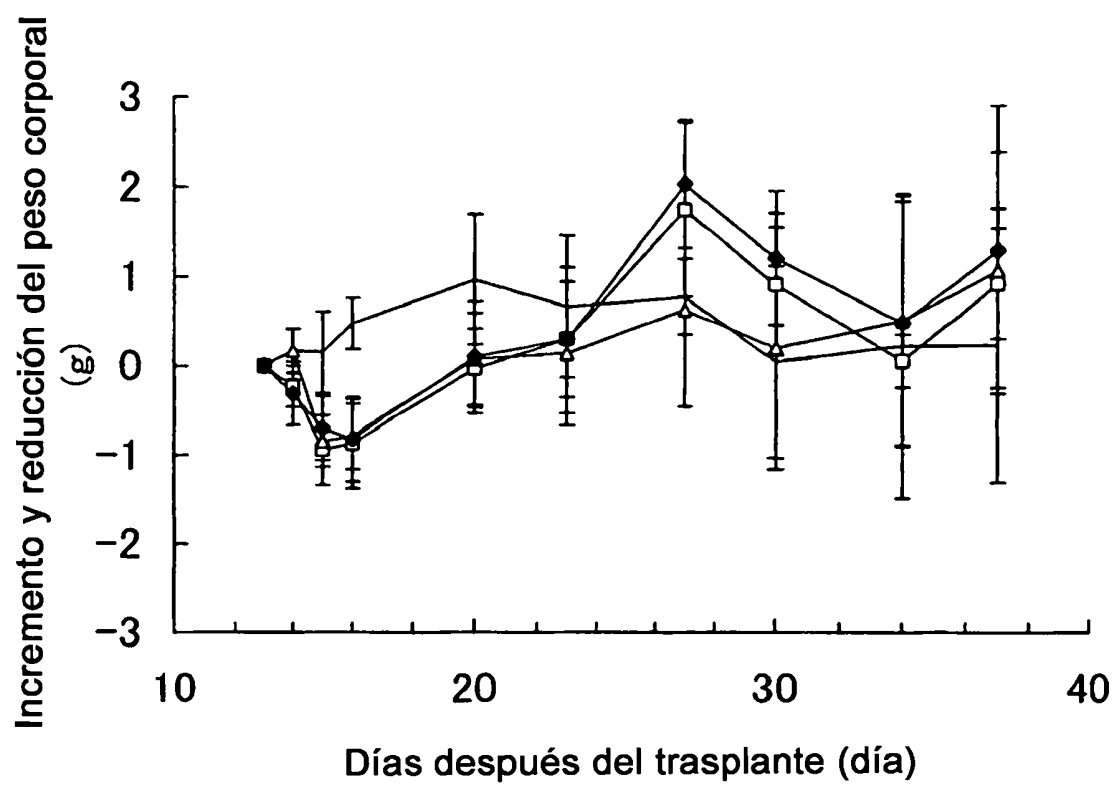


Fig. 11

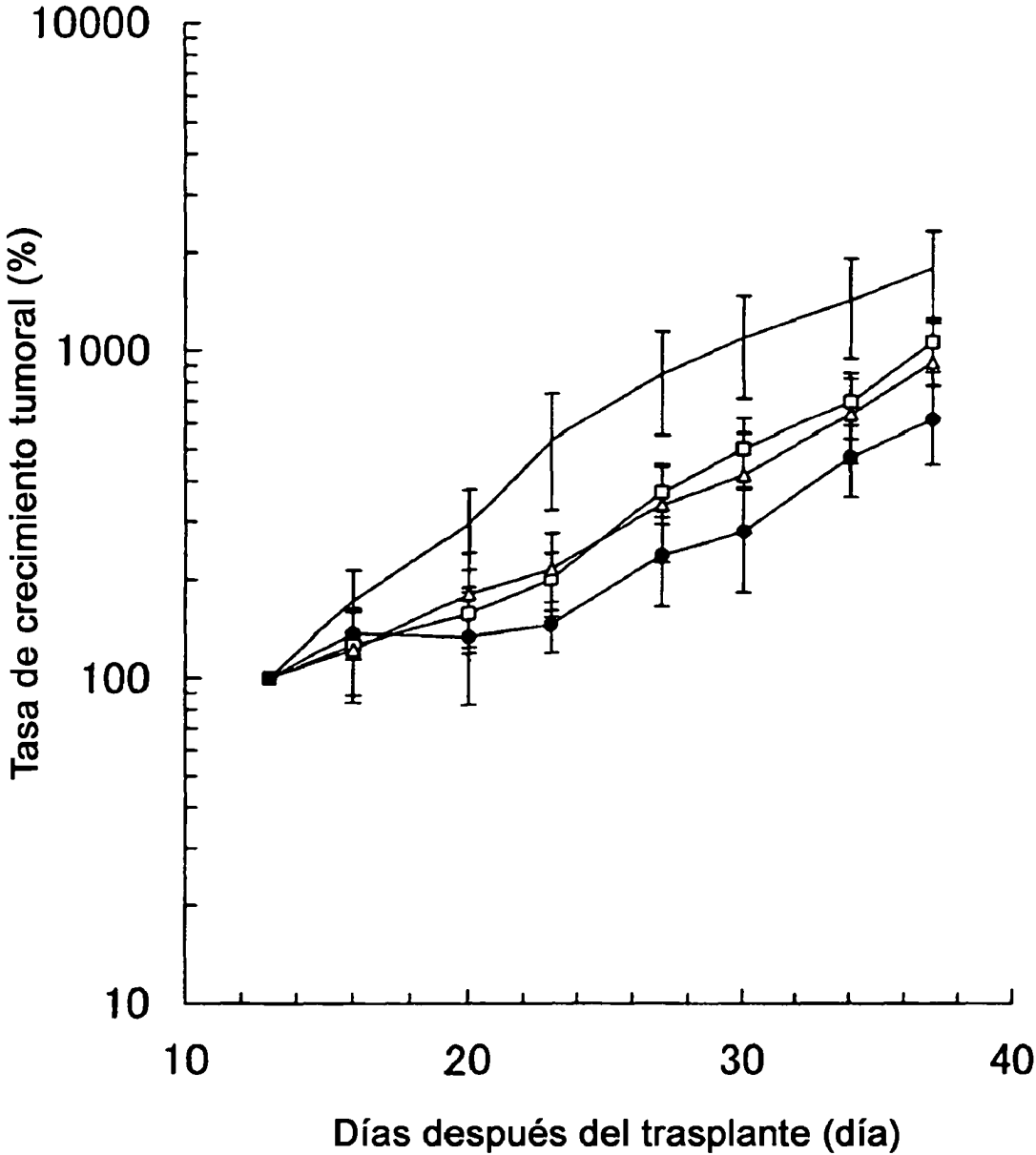


Fig. 12

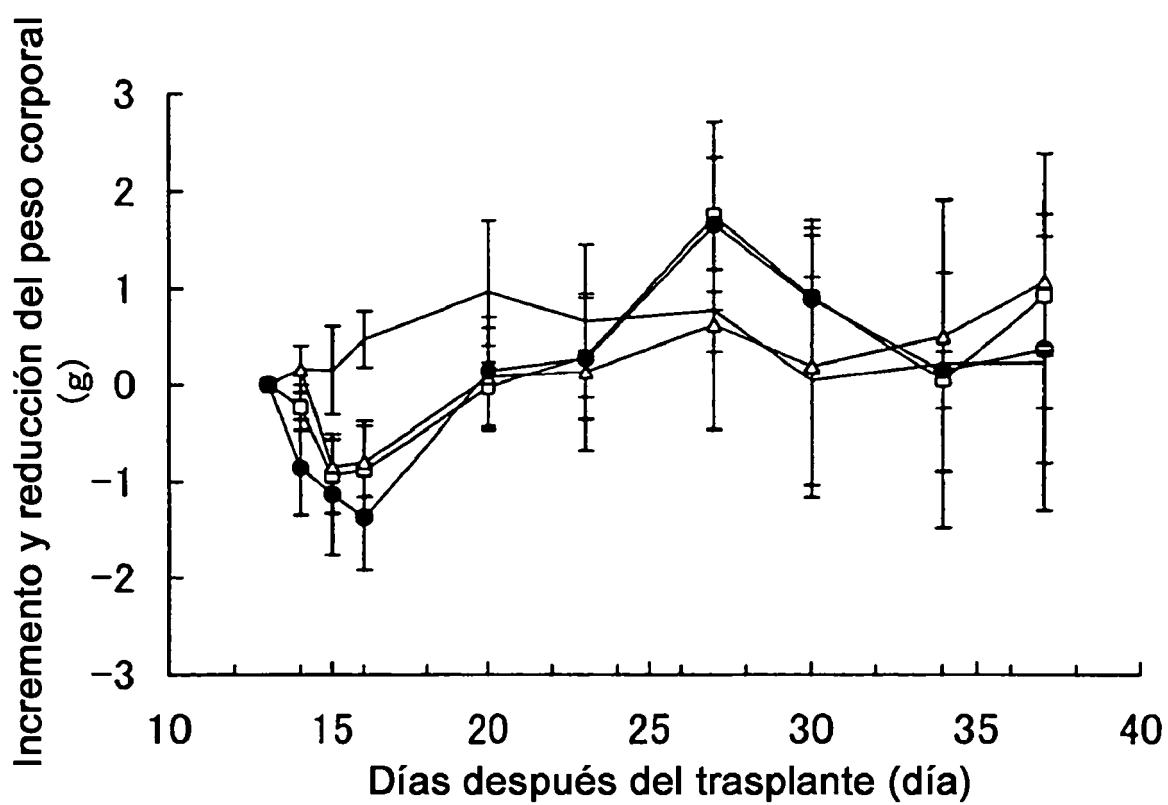
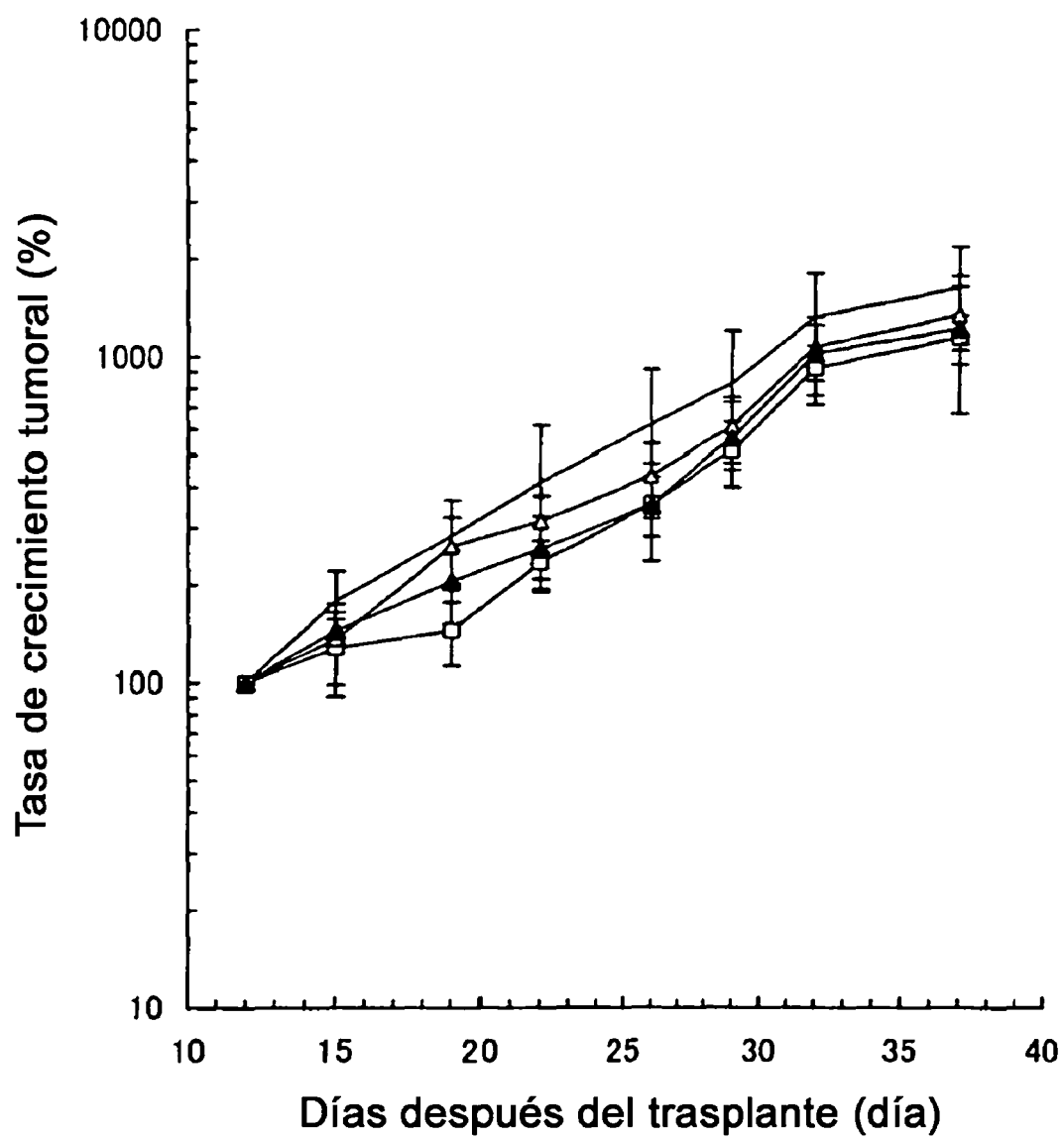


Fig. 13



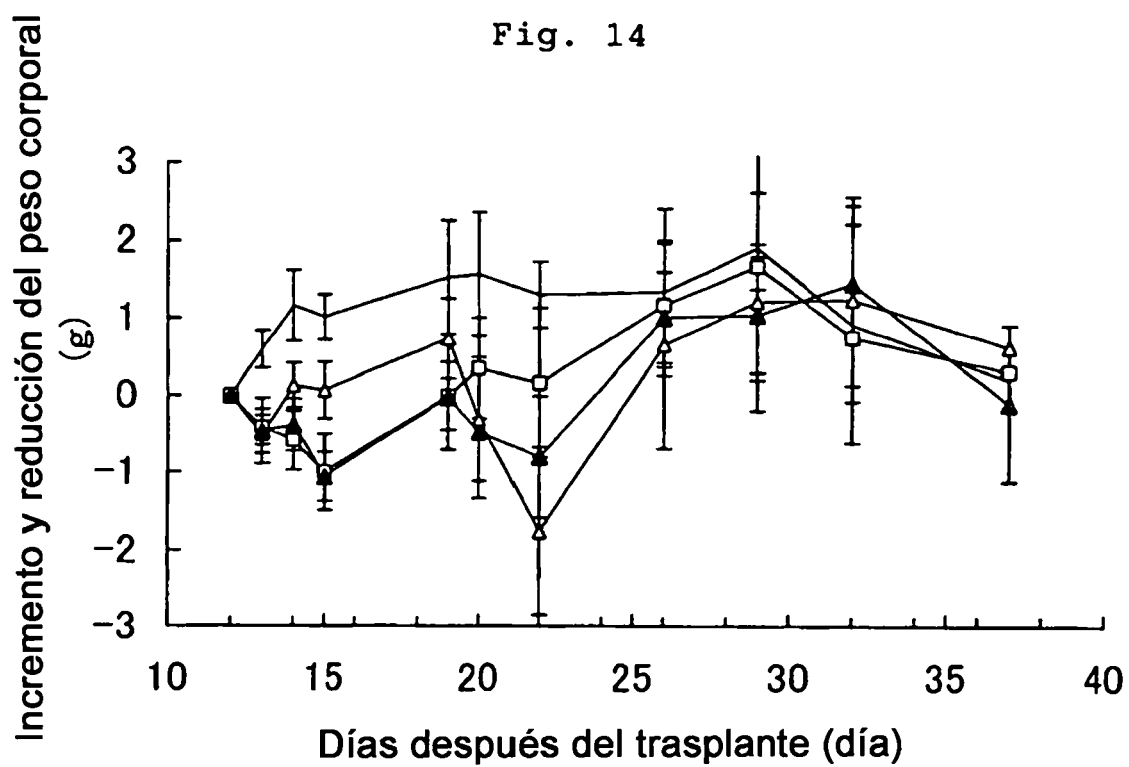


Fig. 15

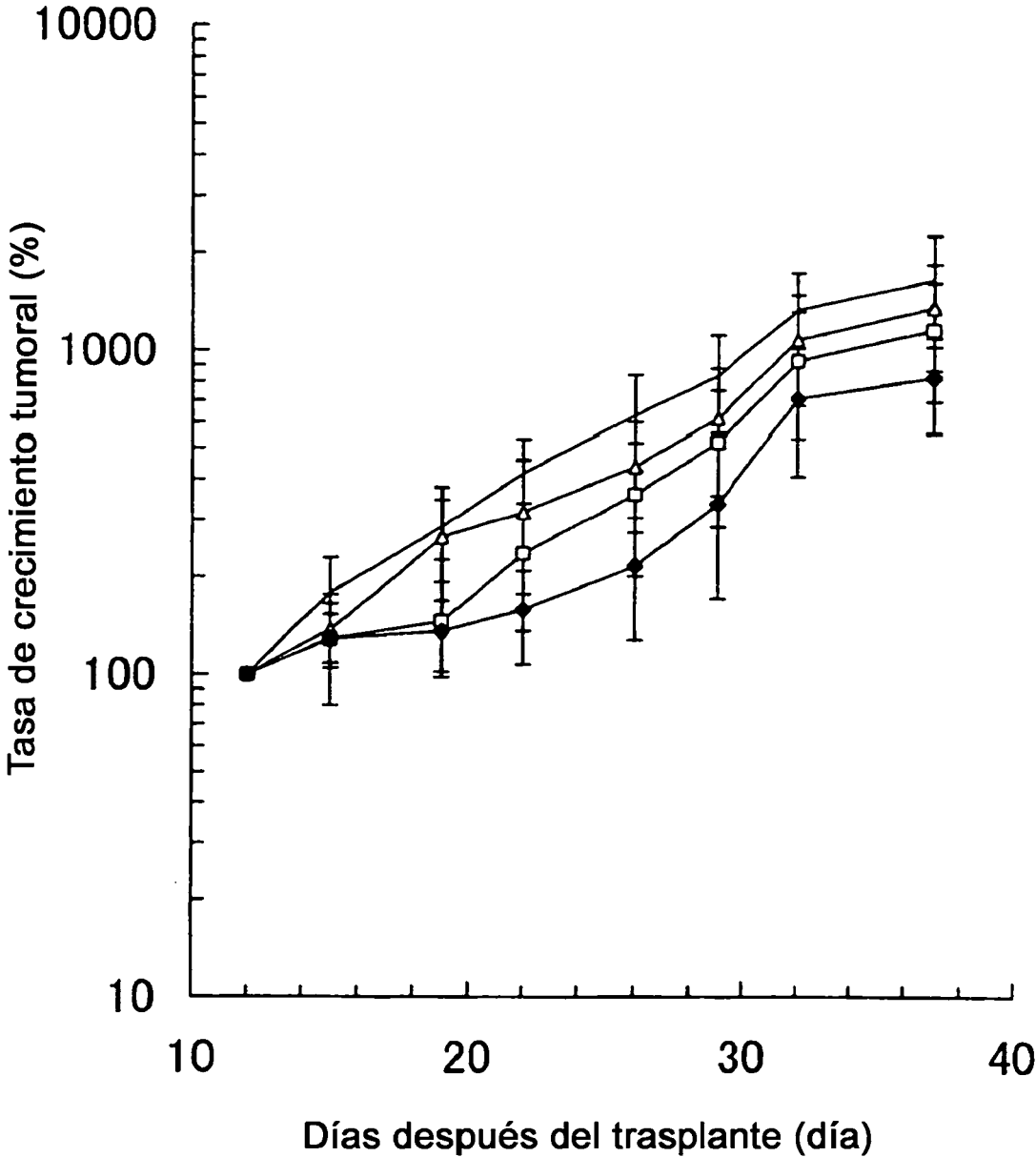


Fig. 16

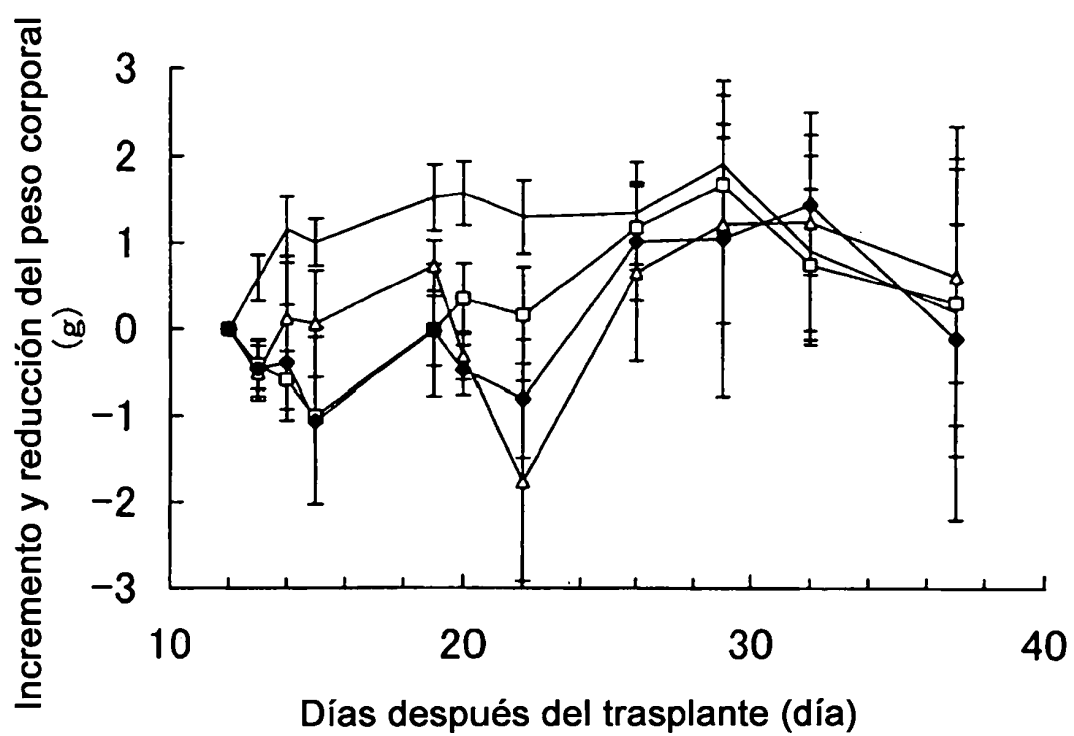


Fig. 17

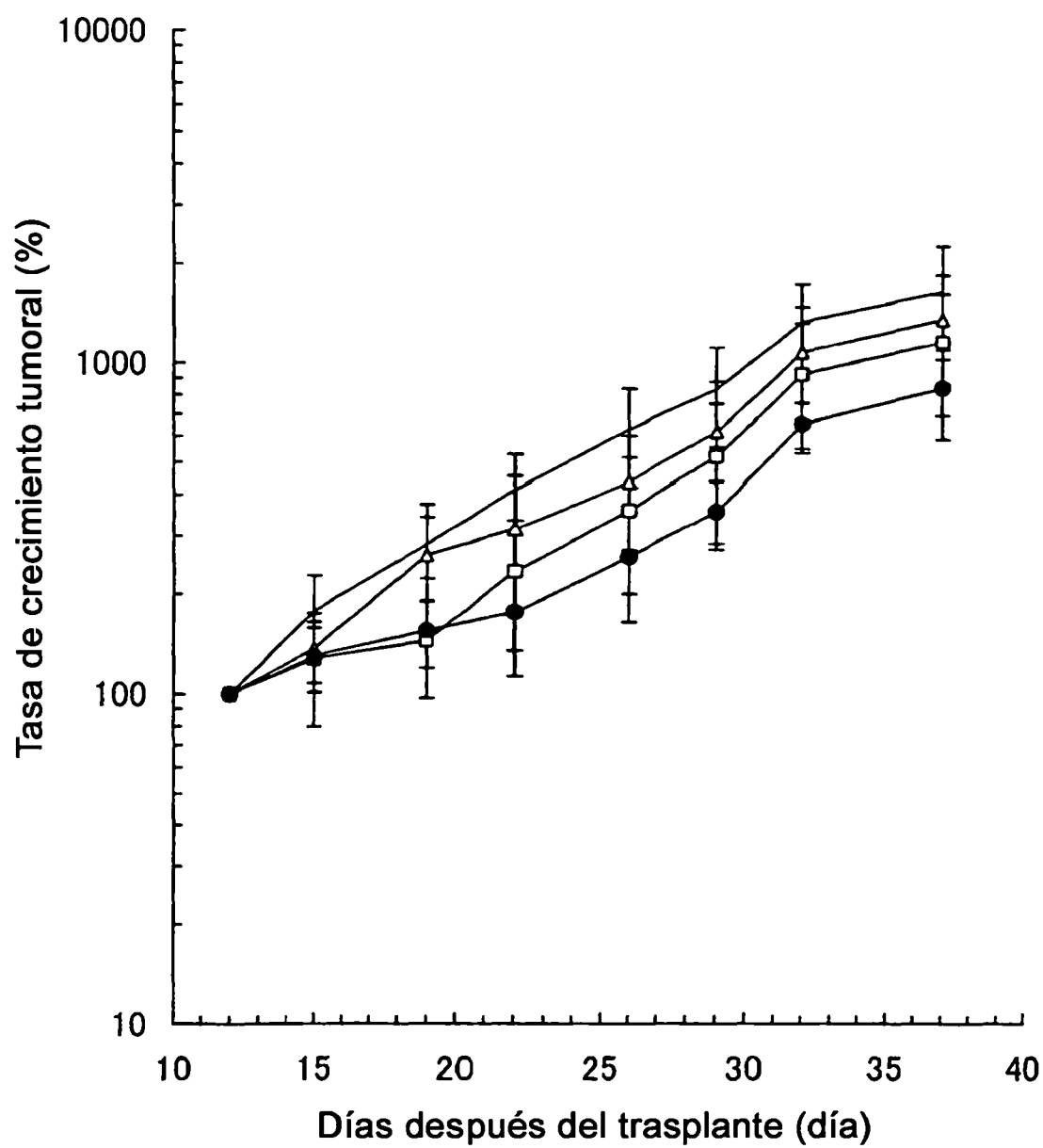


Fig. 18

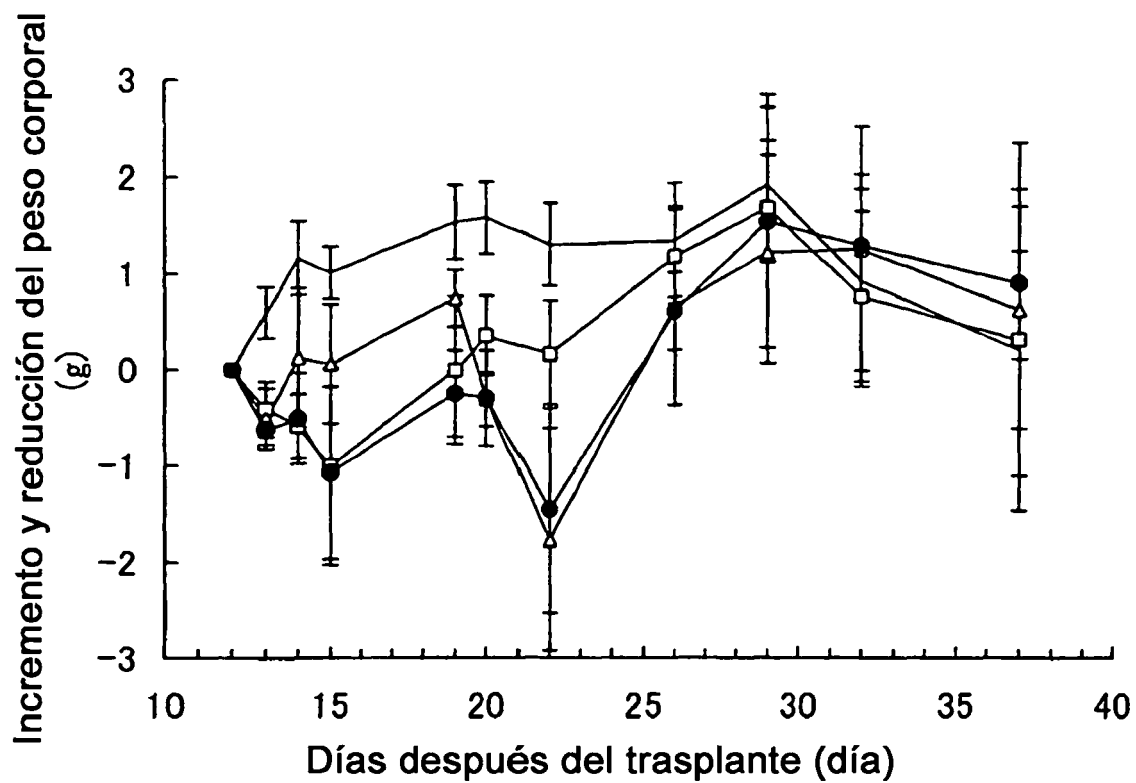


Fig. 19

