

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 108**

21 Número de solicitud: 201131315

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

29.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2013

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

20.02.2013

Fecha de la concesión:

13.06.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.06.2013

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (95.0%)

Plaza de San Diego, s/n.

28801 ALCALA DE HENARES (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID (5.0%)

72 Inventor/es:

GONZALEZ GUIJARRO, Luis;

HERNANDEZ-BREIJO, Borja;

ROMAN CURTO, Irene De Los Dolores;

FERNANDEZ MORENO, María De Los Dolores y

PEREZ GISBERT, Javier

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **USO DE UNA COMBINACIÓN DE AZATIOPRINA Y L-BUTIONINA-[S,R]-SULFOXIMINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE UN TUMOR REFRACTARIO.**

57 Resumen:

La presente invención describe el uso de una combinación de azatioprina (AZA) y L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, preferiblemente cáncer. La combinación de la invención se ha mostrado como especialmente eficiente respecto de la técnica en particular en el tratamiento de tumores sólidos de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado, tumores que presentan gran resistencia a la quimioterapia. La invención también protege la composición farmacéutica en la que se presenta la combinación y el kit que contiene dicha composición.

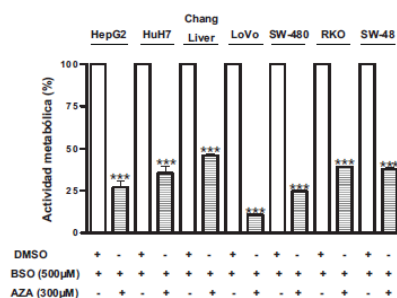


Fig. 6

ES 2 396 108 B2

DESCRIPCIÓN

**USO DE UNA COMBINACIÓN DE AZATIOPRINA Y L-BUTIONINA-[S,R]-
SULFOXIMINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL
TRATAMIENTO DE UN TUMOR REFRACTARIO**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención describe la combinación sinérgica de azatioprina (AZA) y L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) para uso en terapia combinada para el tratamiento y/o quimiosensibilización de tumores refractarios a la quimioterapia convencional. Se encuadra dentro del tratamiento del cáncer por quimioterapia, en el campo de la biomedicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La familia de fármacos conocida como tiopurinas está constituida por el profármaco azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP) y 6-tioguanina (6-TG). Las dos últimas, 6-MP y 6-TG, se utilizan en el tratamiento de leucemias, mientras que la AZA no está indicada para leucemias y sí se utiliza en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como el síndrome de Crohn, colitis ulcerosa, hepatitis autoinmune o esclerosis múltiple entre otras, y también para evitar rechazos en el transplante de órganos.

20

A pesar de la actividad antineoplásica de 6-MP y 6-TG no se han utilizado en el tratamiento de tumores sólidos de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado, debido entre otros factores a la resistencia de dichos tumores a la quimioterapia.

25

La transformación de la AZA en 6-MP se lleva a cabo por un mecanismo dependiente de glutatión (GSH), en el que participa un grupo de enzimas muy heterogéneo desde el punto de vista molecular, pero que tienen todas ellas en común la capacidad de incorporar al sustrato un resto de glutatión; por ello se denominan glutatión-S-transferasas (GSTs). Las isoformas más activas de las GSTs implicadas en la biotransformación de la AZA son muy abundantes en el hígado y en el colon humano y se inducen en el proceso tumoral (Ruzza P et al. "Glutathione transferases as targets for cancer therapy". Anticancer Agents Med Chem. 2009, Vol. 9 (7), pág 763-777). En

30

el cáncer de mama se ha observado que la actividad de las enzimas GSTs está relacionada con la agresividad del cáncer, con la evolución de la enfermedad, y con la respuesta al tratamiento (Bugano DD et al. "Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review". Eur J Gynaecol Oncol. 2008, Vol. 29 (4), pág 313-320). Por ello se han desarrollado diferentes métodos para identificar polimorfismos de la familia de las GSTs, su relación con el desarrollo de la enfermedad y con la eficacia del tratamiento (EP 1999278 A2). Asimismo, se han desarrollado inhibidores de las GSTs que permiten evitar la resistencia a agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer (EP 1865942 A2).

10

Las GSTs son enzimas bisustrato que reconocen a la AZA y al glutation (GSH) y transfieren el GSH al anillo imidazolio de la AZA, liberando 6-MP. Como continuación del proceso, la 6-MP se incorpora al conjunto de nucleótidos gracias a la enzima hipoxantin guanosin fosforribosil transferasa (HGPRT) dando lugar a tiinosin monofosfato (6-TIMP), el cual tras dos etapas enzimáticas, da lugar a 6-tioguanosin monofosfato (6-TGMP). Dicho nucleótido es inactivo al estar defosforilado, por lo que tras dos etapas de fosforilación se obtiene 6-tioguanosín trifosfato (6-TGTP) nucleótido activo capaz de inhibir rac (proteína G pequeña) dando lugar a la apoptosis del linfocito T activado por CD28. (Tiede I et al. " CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes". J Clin Invest. 2003, Vol. 111(8), pág. 1133-1145). Es por lo tanto la molécula de 6-TGTP la que presenta la capacidad de bloquear el proceso patológico en las enfermedades autoinmunes.

15

25

Por otro lado, el nucleótido 6-TGMP (6-tioguanosín monofosfato) formado en la anterior ruta metabólica puede ser transformado por la ribonucleótido reductasa (RR) en desoxi-6-TGMP, que da lugar al nucleótido desoxi-6-TGTP tras dos etapas de fosforilación.

30

Los nucleótidos 6-TGTP y desoxi-6-TGTP se pueden incorporar al ARN y al ADN respectivamente de las células que se están dividiendo activamente, como por ejemplo de los linfoblastos de los pacientes con leucemia (Coulthard SA et al. "The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs". Mol Pharmacol. 2002, Vol. 2(1), pág 102-109). Como consecuencia se forma ARN mensajero y ADN aberrante que dan lugar a mutaciones puntuales y a aberraciones

35

cromosómicas que conducen a la muerte celular por mecanismos dependientes de p53 y del sistema de reparación de ADN conocido como MMR (mismatch repair system) (Zeng X et al. "DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells". Clin Cancer Res. 2007, Vol. 13(4), pág. 1315-1321). Esta última vía es la responsable de los efectos terapéuticos en el tratamiento de la leucemia, pero también de efectos adversos graves como la mielotoxicidad en pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con tiopurinas (Gisbert JP et al. "Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients". Am J Gastroenterol. 2006, Vol. 101(12), pág. 2769-2776) o con otras patologías. El número de leucocitos circulantes depende de la rápida proliferación de sus precursores celulares en la médula ósea, por lo que un aumento exagerado de 6-TGTP y de desoxi-6-TGTP pueden dar lugar a citotoxicidad de los precursores medulares y por lo tanto a mielotoxicidad. La aparición de dicho efecto adverso se ha relacionados con los niveles de tiopurin metiltransferasa (TPMT), enzima que incorpora grupos metilo sobre la el azufre de las tiopurinas y por lo tanto da lugar a moléculas con menor actividad farmacológica. La disminución de la actividad de la TPMT aumenta la probabilidad de padecer mielotoxicidad al ser tratado con AZA (Gisbert JP et al. "Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients". Am J Gastroenterol. 2006, Vol. 101(12), pág. 2769-2776).

Además existe un porcentaje de pacientes (3-5%) que presentan hepatotoxicidad al ser tratados con AZA, lo que se ha relacionado con la reducción de los niveles de glutathion (GSH). Estos datos se han confirmado en estudios llevados a cabo in vitro utilizando hepatocitos normales de rata en cultivo, cuyo tratamiento con AZA da lugar a necrosis, procesos que se revierte con un precursor del glutathion como N-acetilcisteína (Menor C et al. "Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine". J Pharmacol Exp Ther. 2004, vol. 311(2), pág. 668-676). En dicho modelo experimental el BSO, un inhibidor de la síntesis de glutathion, favorece los efectos tóxicos de la AZA sobre los hepatocitos de rata en cultivo (Lee AU et al. "Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury". Journal of hepatology, 2001, Vol. 35(6), pág. 756-764). Esta publicación examina el efecto citotóxico de la combinación de una dosis única de cada

- compuesto, por lo que es imposible saber si hay un fenómeno de sinergia o tal solo de aditividad. En el estudio se demuestra que una de las líneas tumorales utilizadas son resistentes a los efectos de la AZA; en concreto, las células HepG2 procedentes de un hepatoblastoma humano muestran un comportamiento completamente diferente a los
- 5 hepatocitos de rata en cultivo, resultando insensibles tanto a la AZA como a la 6-MP (Lee AU et al. "Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury". *Journal of hepatology*, 2001, Vol. 35(6), pág. 756-764).
- 10 Aunque la asociación de AZA y BSO conduce a una mayor toxicidad que la de ambos fármacos por separado en cultivos de hepatocitos normales de rata, resulta imprevisible el efecto de AZA y BSO sobre las células tumorales de hígado y de colon resistentes a la quimioterapia convencional. Para probar dicho efecto los inventores han estudiado el efecto de la combinación de ambas moléculas sobre células
- 15 tumorales procedentes de hígado, en concreto HepG2, HuH7 y células Chang de hígado (Tsang JY et al. "P-glycoprotein enhances radiation-induced apoptotic cell death through the regulation of miR-16 and Bcl-2 expressions in hepatocellular carcinoma cells". *Apoptosis* 2011, Vol. 16(5), pág 524-535; Hoffmann K et al. "Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-
- 20 binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma". *Anticancer Res* 2010, Vol. 30(11), pág 4503-4508; Buranrat B et al. "Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells". *World J Gastroenterol* 2010, Vol. 16(19), pág 2362-2370) y de colon, en concreto RKO, LoVo, SW48 y SW480 (Lee W et al. "Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic
- 25 resistance in colon cancer". *Cancer Res* 2008, Vol. 68(24), pág 10315-10323; Zhang YF et al. "CIAPIN1 confers multidrug resistance through up-regulation of MDR-1 and Bcl-L in LoVo/Adr cells and is independent of p53". *Oncol Rep* 2011, Vol. 25(4), pág 1091-1098; Chai H et al. "miR-20a targets BNIP2 and contributes chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines". *Acta Biochim*
- 30 *Biophys Sin (Shanghai)* 2011, Vol. 43(3), pág 217-225). Todas ellas tienen en común que son resistentes a multitud de fármacos anticancerosos.

La resistencia se debe a múltiples factores, muchos de ellos desconocidos, entre los que se cuentan el aumento en la expresión de las isoformas de la glutation-S-

35 transferasa, de los niveles de glutation en el interior del tumor o de los niveles de la

glicoproteína P (Abd El-Moneim E et al. "Gene deletion of glutathione-S-transferase M1 and T1 and risk factors of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients". Egypt J Immunol, 2008, Vol. 15(2), pág 125-134); todo ello hace que sea imprevisible el efecto de la quimioterapia en los modelos experimentales de cáncer de hígado y de colon.

5

A estas características moleculares se debe la resistencia a la quimioterapia del hepatoblastoma, del hepatocarcinoma, del cáncer de colon y de las metástasis del cáncer de colon en el hígado humano. Es conocido en la técnica que la elevación intracelular del glutathione se ha asociado con resistencia a la irradiación y a la quimioterapia, y por ello se ha utilizado BSO para sensibilizar los tumores al óxido arsenioso, a la doxorubicina y al melfalan (WO 02/060460). Algunos de estos estudios están en fase clínica.

Kirkpatrick DL describe una disminución de la supervivencia celular de las células EMT6, una línea celular murina de cáncer de mama, con el uso combinado de BSO y purinas disulfuradas en posición 6, en lo que supone la publicación más cercana de la técnica (Kirkpatrick DL. "Modification of antitumor disulfide cytotoxicity by glutathione depletion in murine cells". Cancer research, 1987, Vol. 47(16), pág 4391-4395). Sin embargo las moléculas descritas en dicho trabajo son muy diferentes a la AZA, porque presentan un enlace disulfuro para unir la purina con los diferentes derivados aromáticos y alifáticos, mientras que la AZA tiene un puente tiólico para unir la purina con el anillo imidazólico. Las diferencias estructurales entre dichos compuestos y la AZA, dará lugar a una biotransformación diferente mediante las correspondientes enzimas metabolizadoras y por lo tanto a diferentes compuestos terapéuticos.

25

Los resultados anteriores no ofrecen ninguna garantía de que la combinación de la AZA y del BSO vaya a resultar eficaz en el tratamiento de células tumorales de hígado y de colon.

Existen en la técnica muchos otros principios activos susceptibles de ser probados en combinación con BSO para el tratamiento de tumores sólidos de hígado y colon con mejores expectativas que las tiopurinas, como por ejemplo la combinación de BSO con quinonas (Chew EH et al. Antitumor quinols: role of glutathione in modulating quinol-induced apoptosis and identification of putative cellular proteins targets. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, Vol. 346(1), pág 242-251), taxoles

35

(Hadzic T et al. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H₂O₂-mediated oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 2010, Vol. 48(8), pág 1024-1033), compuestos de platino (Benedetti DT et al. Effects of Noncovalent Platinum Drug-Protein Interactions on Drug Efficacy: Use of Fluorescent Conjugates as Probes for Drug Metabolism. Molecular Pharmaceutics, 2011, Vol. 6(8), pág. 940-948). Estas combinaciones preferentes resultarían en un trabajo preclínico inabordable, y por tanto no sugieren el descubrimiento sorprendente de la combinación de la presente invención.

10 El efecto terapéutico “in vivo” de una combinación de dos fármacos depende, entre otros factores, de la vía de administración y de la biodisponibilidad de ambos fármacos. Los niveles de GSH/GST del paciente en los efectos de ambos medicamentos también son de gran importancia.

15 Aunque existen pocos datos sobre la farmacocinética del BSO, todo hace suponer que es bastante diferente a la de la AZA debido a sus características químicas. La AZA es una molécula hidrofóbica cuya biodisponibilidad por vía oral en la especie humana es del 47% y un $t_{1/2}$ =1.1h valorados a partir de los niveles alcanzados en sangre de 6-MP. El BSO es una molécula hidrofílica que se administra como un racémico, con el isómero L-butionina-[S,R]-sulfoximina como forma activa, con una farmacocinética en
20 la especie humana muy compleja que se ajusta a un modelo lineal de dos compartimentos para el que no existen datos en la bibliografía sobre biodisponibilidad.

Por todo ello, durante el tratamiento con ambas moléculas resulta imposible predecir
25 su comportamiento simultáneo (AZA y BSO) sobre las células tumorales, su efecto farmacológico o terapéutico sobre dichas células tumorales, la existencia de sinergia, aditividad o antagonismo entre ambos medicamentos y la ausencia de efectos tóxicos sobre las células sanas del hígado, riñón, músculo y de otros órganos.

30 El problema que se plantea en la técnica, por tanto, es encontrar fármacos alternativos eficientes en el tratamiento de tumores refractarios a los distintos agentes activos de quimioterapia, en particular cánceres de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado. La solución propuesta por la presente invención es la terapia combinada de AZA y BSO para el tratamiento de este tipo de tumores resistentes.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han descubierto que la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) sensibiliza las células tumorales al tratamiento con azatioprina (AZA).

- 5 Una primera realización de la presente invención es el uso de una combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario.

10 En el la presente solicitud se entiende por “tumor refractario” a tumores resistentes al tratamiento quimioterápico utilizado en primera línea.

15 En la presente invención se entiende que el término “combinación” refiere a una administración de los compuestos de la invención simultánea, secuencial o por separado. En una realización de la invención, “combinación” refiere a la administración simultánea. En otra realización, “combinación” refiere a la administración secuencial. En otra realización más de la invención, “combinación” refiere a la administración por separado. En las realizaciones de administración secuencial o por separado, el retraso en la administración del segundo componente deberá ser tal que ambos compuestos lleguen a estar presentes en el cuerpo del paciente de forma que sean capaces de actuar conjuntamente.

20

El cáncer de hígado, así como las metástasis del cáncer de colon en el hígado, es refractario a la quimioterapia sistémica siendo la resección o el transplante el único tratamiento curativo. Para aquellos tumores irresecables el tratamiento paliativo es la quimioembolización transarterial (TACE), mediante la cual se induce necrosis tumoral por infusión a través de la arteria hepática de lipiodol y/o de partículas de gelatina junto con ciertos agentes quimioterapéuticos, p.ej. cisplatino. Esta estrategia se conoce como tratamiento locorregional del tumor localizado en el hígado, y ensayos clínicos realizados recientemente han demostrado su eficacia. Para mejorar la eficacia de este tratamiento esperanzador se necesitan nuevos fármacos que actúen por un mecanismo diferente al ya probado para buscar nuevas asociaciones beneficiosas. La combinación de AZA y BSO de la presente invención va a tener especial utilidad en el tratamiento del tumor localizado en el hígado tanto primario como metastático.

25

30

De forma que en otra realización de la invención dicho tumor refractario es un cáncer. En una realización preferible dicho cáncer es un blastoma, más preferiblemente un hepatoblastoma. En otra realización preferible dicho cáncer es un carcinoma, más preferiblemente un carcinoma hepático o un carcinoma de colon. En otra realización preferible más, dicho cáncer es una metástasis de un carcinoma de colon, y en otra más dicho cáncer es una metástasis de un cáncer primario de hígado.

Debido a que en el tratamiento contra el cáncer se suele usar terapia múltiple, otra realización de la invención es el uso de una combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno.

La presente invención también contempla el suministro al profesional médico de cada uno de los componentes por separado. Así, una realización más es el uso de AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con BSO o sus sales farmacéuticamente aceptables. O bien, el uso de BSO o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables.

Expresado de otra forma, la presente invención es la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de un tumor refractario, preferiblemente un cáncer, más preferiblemente un blastoma y aún más preferiblemente un hepatoblastoma. Otra realización preferible es que dicho cáncer sea un carcinoma, más preferiblemente un carcinoma hepático o un carcinoma de colon. Y otra realización preferible es que dicho cáncer sea una metástasis de un carcinoma de colon o una metástasis de un cáncer primario de hígado. Resulta interesante utilizar la combinación de la invención en terapia combinada, de forma que una realización más es la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento contra un tumor refractario donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno. Otra realización más es AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento contra un tumor

refractario en terapia combinada con BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables; o bien BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento contra un tumor refractario en terapia combinada con AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables.

5

No resulta obvio que el profármaco AZA junto con BSO sea eficaz en las células tumorales y no lo sean los antineoplásicos 6-TG y 6-MP con BSO. De acuerdo a las enseñanzas de la técnica debería ser al contrario. Tampoco es obvio que la asociación sea eficaz *in vivo* sobre el hepatoblastoma sin efectos adversos de consideración sobre el hígado, corazón y músculo del ratón. Este resultado depende entre otros factores de la farmacocinética, de la que hay pocos resultados sobre todo respecto a BSO, pero también de la AZA como fármaco activo ya que sólo se miden los niveles de su producto derivado en sangre, la 6-MP.

10

15

Una realización muy preferible de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición puede comprender diversas formulaciones galénicas con distintos excipientes como atadores, rellenos, lubricantes, recubridores; partículas de hidrogel biodegradable hidrofóbico e hidrofílico, emulsiones lipídicas, micelas, liposomas, polímeros dendríticos, nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas de oro coloidal o cristal líquido.

20

25

Otra realización más preferible aún es dicha composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor refractario en un sujeto, preferiblemente administrado en el tracto gastrointestinal, o bien por vía endovenosa o por vía peritumoral. La composición farmacéutica de la invención es preferiblemente una emulsión y más preferiblemente una efusión grasa. El sujeto al que se le administra la invención es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un paciente humano.

30

Una realización más es la composición farmacéutica de la invención en que la administración de AZA y BSO se realiza de forma simultánea. Otra realización es que la administración de AZA y BSO se realice de forma separada o secuencial.

La realización más preferible de la invención es un método de tratamiento de un tumor refractario en un mamífero, preferiblemente humano, que comprende administrar a dicho mamífero afectado por la enfermedad una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables. Y otra
5 realización más es un método de tratamiento de un tumor refractario, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprenda la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, a un sujeto preferiblemente humano en necesidad de ella.

10 Una realización muy preferible de la invención es un kit que incluye contenedores separados que contienen al menos dos formulaciones farmacéuticas que comprenden AZA y BSO conjuntamente o por separado, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables e instrucciones para el uso de uno de esos componentes en conjunción
15 con el otro componente. O bien un kit que comprende AZA y BSO aptos para su administración simultánea, separada o secuencial para el tratamiento de un tumor gastrointestinal en un sujeto, preferiblemente un paciente humano.

A diferencia de los experimentos “in vitro”, en los modelos “in vivo” los efectos de AZA y BSO dependen de la liberación, absorción, permeabilidad, transporte, distribución,
20 activación/ desactivación metabólica y excreción (LADME) de ambos agentes activos, parámetros que no resultan predecibles para ningún fármaco. Por ello, los efectos sinérgicos encontrados para la combinación de la invención han resultado tan sorprendentes.

25 La inducción de tumores por la implantación subcutánea de células procedentes de un hepatoblastoma HepG2 en ratones atímicos, que es el modelo experimental utilizado en la presente invención, es un modelo clásico para el estudio del efecto de la quimioterapia administrada localmente sobre el crecimiento tumoral.

30 Las propiedades farmacológicas de la asociación de AZA y BSO en el tratamiento de los tumores de hígado y tracto gastrointestinal se muestran en los resultados de los ejemplos aportados en la presente solicitud.

La sinergia terapéutica de la combinación AZA y BSO queda documentada en el
35 Ejemplo 1. La AZA más el BSO indujeron en las células HepG2 muerte celular,

mientras que AZA o BSO separadamente en las mismas concentraciones fueron ineficaces de llevar a cabo tal efecto. Se observaron efectos significativos a partir de 125 μM de AZA y 500 μM de BSO. Los resultados demuestran que el tratamiento con BSO potencia los efectos de AZA en estas células aumentando la eficacia en 6,8 veces con respecto a la AZA en solitario. La concentración efectiva del 50% ($\text{CE}_{50\%}$) de AZA en ausencia de BSO fue de 781 μM , mientras que la $\text{CE}_{50\%}$ de AZA en presencia de BSO fue de 115 μM . Esta última concentración es entre 8,9 y 17,9 veces menor que los niveles plasmáticos de AZA alcanzados en el tratamiento de enfermos de Crohn mediante una dosis de carga de 20 o de 40 mg de AZA/ Kg de peso del paciente (Mahadevan U et al. "Intravenous azathioprine in severe ulcerative colitis: a pilot study". Am J Gastroenterol, 2000, Vol. 95(12), pág 3463-3468), lo que indica que la concentración de AZA necesaria para destruir las células cancerosas sensibilizadas con BSO es compatible con las concentraciones del fármaco alcanzadas en el tratamiento de otras enfermedades. El estudio de Mahadevan et al. nos permite definir el límite superior de la ventana terapéutica en la especie humana. En dicho ensayo clínico se administró azatioprina, cuyo peso molecular es de 277,26 gr/mol, a dos dosis de 20 o 40 mg/kg peso por vía intravenosa, lo que supone unas concentraciones circulantes de AZA en el momento de la infusión de entre 1030 μM y 2060 μM , considerando un volumen de sangre de 4,9 litros. En dicho estudio se observó que los efectos adversos en el tratamiento con AZA a dosis de carga o tratamiento agudo fueron ligeramente superiores a los observados en la administración oral o tratamiento crónico, en el se utilizan menores dosis de AZA (1,5-3,0 mg/kg de peso) durante períodos largos de tiempo. Por lo tanto, comparando la concentración necesaria de AZA para destruir el 50% de las células tumorales sensibilizadas con BSO ($\text{CE}_{50\%} = 115 \mu\text{M}$), con la concentración del fármaco (1030-2060 μM) alcanzado en sangre en el estudio de Mahadevan et al., se puede concluir que la combinación de AZA mas BSO debe ser eficaz en el tratamiento de tumores quimioresistentes sin incrementar dramáticamente los efectos adversos. Extrapolando estos resultados al tratamiento de tumores quimioresistentes en la especie humana, se puede decir que se alcanzaría la ventana terapéutica para AZA a las dosis que ya se utilizan en el tratamiento agudo de la enfermedad de Crohn, a condición de que se sensibilizaran con BSO.

La selectividad del efecto del tratamiento en diferentes tipos de células tumorales se representa en el los resultados del Ejemplo 2, que muestra la eficacia terapéutica de

AZA y del BSO en todas las células tumorales utilizadas de procedencia gastrointestinal de colon e hígado que demostraron previamente ser resistentes a múltiples fármacos, lo cual demuestra que puede ser útil en el tratamiento de cáncer de hígado, de colon y de las metástasis del cáncer de colon en el hígado.

5

La especificidad farmacológica de la azatioprina frente a otras tiopurinas se detalla en el Ejemplo 3, que muestra que el efecto terapéutico se debe al profármaco AZA y en mucha menor medida a los metabolitos subsiguientes: 6-mercaptopurina y 6-tioguanina, considerados activos, o 6-metiltioguanina y 6-metilmercaptopurina, considerados inactivos. Los resultados indican que la asociación AZA y BSO puede ser eficaz porque actúa por un mecanismo diferente al resto de las tiopurinas, probablemente porque interfiere con el sistema GSH/Glutation-S-Transferasa necesario en la transformación de la AZA y no en la transformación del resto de las tiopurinas estudiadas. El resultado de la acción de la AZA en combinación con BSO sería la inducción de un proceso de muerte celular dependiente de GSH/GST que podría ser crítico en tratamiento de tumores del tracto gastrointestinal referidos previamente. En el momento actual no se conoce ningún fármaco de uso clínico para el tratamiento de los tumores quimioresistentes que actúe sobre dicha diana terapéutica.

20 El mecanismo molecular implicado en el proceso terapéutico o señalización se muestra en los resultados del Ejemplo 4, que destacan la importancia del estrés oxidativo y las quinasas activadas por estrés (JNK y p38) en la inducción de la muerte de las células HepG2. Previamente, se ha descrito en la técnica que la activación de JNK provoca un incremento de la proteína bax o una translocación de bax a la mitocondria. Los inventores han observado también un incremento de bax después del tratamiento de AZA más BSO sin cambios en las proteínas de bcl-2, bad o bid (Figura 9).

30 El resultado del Ejemplo 5 muestra que el tratamiento combinado de BSO y AZA produce la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial. Esto predispone a la célula al desarrollo de una muerte celular programada.

Respecto a los efectos terapéuticos *in vivo*, el resultado del Ejemplo 6 muestra cómo los resultados obtenidos *in vitro* son extrapolables a un modelo de xenoinjerto de HepG2 en ratones atímicos. El tratamiento combinado con AZA y BSO por vía

35

peritumoral produjo una reducción significativa del volumen del tumor con respecto a los otros tres grupos estudiados, DMSO, AZA o BSO. El tratamiento combinado de AZA y BSO no produjo cambios significativos en los niveles de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatina quinasa (CK) con respecto al grupo tratado con AZA solamente. Esto indica que la toxicidad de la combinación de ambos medicamentos no tiene mayor toxicidad sistémica en hígado, corazón, músculo o riñón que la correspondiente a la observada para la AZA. Las dosis usadas en este estudio preclínico en ratones son muy similares a las utilizadas en el tratamiento con AZA por vía oral de pacientes con enfermedades autoinmunes y en los ensayos clínicos con BSO que se están llevando a cabo. Las dosis utilizadas de AZA, 6 mg/kg peso, en el presente estudio son menores que las usadas para dicha molécula en la especie humana cuando se administra por vía endovenosa para colitis ulcerosa, de hasta 40 mg/kg peso.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra la viabilidad celular de las células HepG2 con respecto al tiempo a diferentes concentraciones de AZA. Las concentraciones de AZA son las siguientes: 0 μM (DMSO) (\circ), 75 μM (\blacktriangle), 150 μM (\blacktriangledown), 300 μM (\blacklozenge), 600 μM (\bullet), 1000 μM (\square). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos: $P < 0.001$ (***) .

La figura 2 muestra la actividad metabólica de las células HepG2 con respecto al tiempo a diferentes concentraciones de AZA. Las concentraciones de AZA son las siguientes: 0 μM (DMSO) (\circ), 75 μM (\blacktriangle), 150 μM (\blacktriangledown), 300 μM (\blacklozenge), 600 μM (\bullet), 1000 μM (\square). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) .

La figura 3 muestra la actividad metabólica de las células HepG2 tratadas previamente con BSO para diferentes concentraciones de AZA. Los signos de los tratamientos son los siguientes: AZA (\circ), BSO (500 μM) + AZA (\bullet). Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, se indican con los siguientes signos: $P < 0.001$ (***) .

La figura 4 muestra la sensibilización de las células HepG2 con respecto al tiempo a una concentración de AZA tratadas previamente con BSO. Los signos de los tratamientos son los siguientes: AZA (150 μM) (\circ), BSO (500 μM) + AZA (150 μM)

(●). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)).

5 **La figura 5** muestra el efecto sobre el nivel intracelular de GSH, de BSO (500 μM) + AZA (300 μM), y de AZA (300 μM), según el tiempo de tratamiento con AZA. Las diferencias estadísticamente significativas se comparan con respecto a su control de cada serie (0h de tratamiento con AZA). Se indican con los siguientes signos: $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***). El efecto del BSO (500 μM) se compara con respecto a su control a 0h de tratamiento con AZA (\ddagger , $P < 0.001$)

10 **La figura 6** muestra la sensibilización de las células de cáncer de hígado (HepG2, HuH7 y Chang Liver) y de las células de cáncer de colon (LoVo, SW-480, RKO y SW-48) al tratamiento con BSO + AZA. Las diferencias con respecto al control (DMSO + BSO) que alcanzaron la significatividad estadística se indican con los siguientes signos: $P < 0.001$ (***).

15 **La figura 7** muestra la actividad metabólica de las células HepG2 tratadas con DMSO, BSO, AZA y con sus metabolitos secundarios 6-mercaptopurina (6-MP), 6-metilmercaptopurina (6-MMP), 6-tioguanina (6-TG) y 6-metiltioguanina (6-MTG). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO + BSO) se indican con los siguientes signos: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***).

20 **La figura 8** muestra la importancia de las quinasas activadas por estrés, JNK y p38, en la inducción de la muerte celular de HepG2. La combinación BSO + AZA produce la activación de las rutas de señalización de las quinasas del estrés activando su fosforilación (JNK y P38). Esta activación se bloquea con los inhibidores de las propias quinasas (SP=SP600125, SB=SB203580) o con el precursor de la síntesis de GSH, N-acetilcisteína (NAC).

25 **La figura 9** muestra la variación en los niveles de las proteínas Bax, Bad, Bid, Bcl-2 y β -tubulina después del tratamiento a diferentes tiempos con la combinación BSO (500 μM) + AZA (300 μM).

30 **La figura 10** muestra la reducción del volumen del tumor a lo largo de los días de tratamiento con distintos fármacos: DMSO (■), BSO (▼), AZA (▲), BSO + AZA (●) a las dosis indicadas en el texto. Las diferencias con respecto al control (DMSO) estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos: $P < 0.05$ (*).

La figura 11 muestra la reducción del tumor en dos ratones atómicos a los que se les implantaron 10^7 células HepG2. El de la izquierda fue tratado con 0.1 ml DMSO (5%) y el de la derecha fue tratado con BSO (90 mg/kg/día) + AZA (6 mg/kg/día).

La figura 12 muestra los niveles de GSH en los tumores en el momento del sacrificio (12 días) cuando los animales fueron tratados con 0.1 ml DMSO (5%), BSO (90 mg/kg/día), AZA (6 mg/kg/día) o BSO (90 mg/kg/día) + AZA (6 mg/kg/día). Las diferencias con respecto al control (DMSO) estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos: $P < 0.01$ (**).

La figura 13 muestra la actividad enzimática de la enzima ALT (alanina transaminasa) plasmática de los animales tratados con DMSO, BSO, AZA o BSO + AZA en las condiciones de la figura 12.

La figura 14 muestra la actividad enzimática del enzima AST (aspartato transaminasa) plasmática de los animales tratados con DMSO, BSO, AZA o BSO + AZA en las condiciones de la figura 12. Las diferencias con respecto al control (DMSO) estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos: $P < 0.01$ (**).

La figura 15 muestra la actividad enzimática de la CK (creatina quinasa) plasmática de los animales tratados con DMSO, BSO, AZA o BSO + AZA en las condiciones de la figura 12.

20 **EJEMPLOS**

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Metodología General

25 La azatioprina (AZA) fue cedida por Celltech Pharma S.A. (Madrid, España). El MEM, el suero bovino fetal y la solución antibiótica/antimicótica se adquirieron de GIBCO (Madrid, España). Los anticuerpos contra fosfo-p54/46 JNK (quinasa N-terminal c-jun), p-p38, JNK, p38 y β -tubulina eran de Cell Signalling Technology Inc. (Beberly, Masachussets) y los anticuerpos contra Bax, Bid, Bad, Bcl-2, citocromo c, caspasa 3,
30 GCS, PARP eran de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). El inhibidor de p-38 (SB203580, 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol), el inhibidor de JNK (SP600125, 1,9-pirazoloantrona), la IgG anti-conejo y anti-ratón

conjugada a peroxidasa de rábano picante eran de Calbiochem (Barcelona, España). El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), la 6-mercaptopurina (6-MP) y la 6-metilmercaptopurina (6-MMP) eran de Sigma Chemical Co. (Madrid, España). La 2-amino-6-mercaptopurina (6-TG) y la 2-amino-6-metilmercaptopurina eran de ICN Biomedicals Inc. (Ohio, USA.). El inhibidor de caspasa 3, Z-VAD-mfk, era de Bachem. Ac-DEVD-AMC era de Alexis biochemicals. OxyBlot™ Protein Oxidation Kit era de Millipore. Los reactivos de detección del Western blot, ECL, e Hyperfilm fueron proporcionados por Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Reino Unido) y la acrilamida/bisacrilamida de Bio-Rad Laboratories (Hércules, CA). Todos los reactivos eran del grado más alto de pureza disponible en el mercado.

Los animales utilizados para llevar a cabo los experimentos *in vivo* fueron ratones desnudos atímicos del tipo Athymic Nude-Foxn1 nu de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN).

15

Ejemplo 1: Resistencia de las células tumorales a la Azatioprina y su sensibilización por BSO.

Células de las líneas HepG2, HuH7 y Chang (Sigma Chemical Co.) se hicieron crecer en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y solución antibiótica/antimicótica al 1% y se mantuvieron en una incubadora a 37°C humidificada con CO₂ al 5%. Para comprobar la resistencia de las células HepG2, se estudió la viabilidad celular y la actividad metabólica frente a AZA a distintas dosis. La actividad metabólica se analizó mediante un ensayo de reducción de MTT tal como se ha descrito previamente (Alley et al. "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay". Cancer Res, 1988, Vol. 48(3), pág. 589-601), con ligeras modificaciones. Estas modificaciones consistieron en que después de la incubación con AZA se añadió al cultivo celular solución de reserva de MTT en PBS, para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml de MTT en el medio. Las células fueron incubadas durante 3 h más a 37°C. Se disolvieron cristales de formazán en HCl 0,1M en isopropanol y la absorbancia se midió usando un lector de microplacas a una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 650 nm. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión de azul tripano según lo descrito por Shin et al. (Shin KJ et al. "2,2',4,6,6'-pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells". Toxicol Appl Pharmacol, 2000, Vol. 169(1), pág. 1-7). Los resultados mostraron que las células HepG2 eran muy resistentes a las

35

diferentes dosis de AZA (figuras 1 y 2). A continuación se realizaron ensayos para comprobar la sensibilización de las células a la AZA por tratamiento con BSO. Para ello, células HepG2 fueron tratadas previamente con BSO (500 μ M durante 24 h). Los datos mostraron que el BSO sensibilizaron las células HepG2 a la AZA (figura 3) y que la sensibilización de la célula HepG2 mediante pretratamiento con BSO (500 μ M) fue significativa desde 6 h de tratamiento con AZA (figura 4). Por otro lado, se comprobó el efecto de BSO (500 μ M) y AZA (300 μ M) sobre los niveles intracelulares de GSH (figura 5). Los niveles intracelulares de GSH se determinaron fluorimétricamente según lo descrito por Hissin y Hilf (Hissin PJ et al. "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues". Anal Biochem, 1976, Vol. 74(1), pág. 214-26), con ligeras modificaciones. Estas modificaciones consistieron en que, después del tratamiento, el homogenizado celular obtenido en tampón de fosfato sódico 0,1 M-EDTA 5 mM (pH 8) se trató con perclorato potásico al 14% para precipitar las proteínas. Después de centrifugar, el GSH se estimó verificando la intensidad de fluorescencia de los aductos de OPT-glutathione a 420 nm con la longitud de onda de excitación a 350 nm. Como resultado de este ensayo se comprobó que las células HepG2 fueron sensibles al tratamiento con BSO (500 μ M) más AZA (300 μ M) ya que se redujeron los niveles de GSH en las células (figura 5). También se comprobó que diferentes líneas celulares, tanto de cáncer de hígado (HepG2, HuH7 y Chang) como de cáncer de colon (LoVo, SW-480, RKO y SW-48) fueron sensibles al tratamiento con BSO (500 μ M) más AZA (300 μ M) ya que se redujo en ellas significativamente la actividad metabólica con respecto al vehículo (DMSO) (figura 6).

25 **Ejemplo 2: Especificidad de la Azatioprina.**

Para comprobar que el efecto farmacológico observado del Ejemplo 1 es específico de AZA y no de sus metabolitos secundarios, se realizaron los mismos experimentos anteriores con dichos metabolitos (6-mercaptopurina, 6-metilmercaptopurina, 6-tioguanina y 6-metiltioguanina) en combinación con BSO. El resultado mostró que todos ellos sólo producían un pequeño efecto sobre la muerte de células HepG2 (figura 7).

Ejemplo 3: Inducción de la muerte celular programada de las células HepG2 por AZA + BSO.

Las proteínas se extrajeron de las células HepG2 usando un tampón de Tris (50 mM), pH 8, que contenía NaCl (150 mM), EDTA (5 mM), EGTA (1 mM), PMSF (0.1 mM), ortovanadato (1 mM), NaF (30 mM), leupeptina (2 µg/ml), aprotinina (10 µg/ml), DTT (1 mM) y triton x-100 (1%). La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal Biochem., 1976, Vol. 7(72), pág 248-254). Las proteínas se incubaron con tampón de carga durante 5 minutos a 95°C y se cargaron sobre gel de SDS-PAGE para llevar a cabo la electroforesis y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante la noche a 25 V y 4°C. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-Tween. Las inmunotransferencias se revelaron usando anticuerpos específicos contra pJNK, p-p38, JNK, p38, Bax, Bid, Bad, Bcl-2. Los anticuerpos secundarios usados fueron IgG anti-conejo y anti-ratón conjugada a peroxidasa de rábano picante. Se usaron potenciadores de la quimioluminiscencia de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y las membranas resultantes se expusieron a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). La AZA (300 µM) o la BSO (500 µM) solas fueron incapaces de activar JNK1/2 mientras que en combinación produjeron un incremento drástico de la fosforilación de JNK1/2 que fue inhibida por el inhibidor de JNK SP600125 (Figura 8). La activación de JNK1/2 se tradujo en la translocación de bax a la mitocondria sin cambios en Bad, Bid o Bcl-2 lo que involucra a la mitocondria en la muerte celular inducida por AZA + BSO (figura 9).

Ejemplo 4: Integridad de la membrana mitocondrial

La integridad de la membrana mitocondrial se estimó usando una sonda JC-1 (yoduro/cloruro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina) basada en un método de detección del potencial de membrana mediante citometría de flujo ($\Delta\Psi$) (mito-screen, Becton Dickinson, BD Bioscience, San José, California). Este método se basa en la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) como una señal de la muerte celular. Esta sonda se usa para medir cambios de potencial de la membrana mitocondrial en células: En las células viables, JC-1 se acumula como agregados en la mitocondria, dando como resultado fluorescencia roja (570 nm). El brillo de la fluorescencia roja es proporcional a $\Delta\Psi$ y varía entre diferentes tipos. Sin embargo, en células con la mitocondria dañada, JC-1 existe en forma de monómero y tiñe las células de verde (530 nm). 1×10^6 células/0,5 ml se incubaron con JC-1 durante 10 minutos a 37°C en el incubador con CO₂. Después del lavado, el análisis

de las muestras se realizó usando un citómetro FacsAria (Becton Dickinson, San Jose, CA). Este citómetro está equipado con tres láseres a las siguientes longitudes de onda: 488, 633 y 405 nm. Se usó un láser de 488 nm. Se usaron detectores de las áreas de FWS frente a SSC y FITC frente a PE. El área de SSC frente a SSC se usó para excluir dobletes en la muestra. El análisis de los datos se realizó con software FacsDiva y se obtuvieron, en resumen, los siguientes resultados (células con membrana mitocondrial intacta: DMSO=85%, BSO (500 μ M) + AZA (300 μ M) =2%). Estos resultados confirman la participación de la mitocondria en la muerte celular programada inducida por la combinación de AZA plus BSO.

10

Ejemplo 5: Análisis de la actividad de caspasa-3

Después de los tratamientos con BSO (500 μ M) y con BSO (500 μ M) + AZA (300 μ M); las células HepG2 se lavaron dos veces con PBS a 4°C y se sometieron a lisis añadiendo tampón de lisis a 4°C que contenía Tris-HCl 10 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 130 mM, Triton-X-100 al 1%, NaPPi (pirofosfato sódico) 10 mM. El extracto se centrifugó a 20.000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C. El lisado celular se incubó durante 60 min a 37°C en un tampón que contenía HEPES 20 mM (pH 7,5), glicerol al 10%, DTT 2 mM que contenía el sustrato fluorescente específico de la caspasa-3 (Ac-DEVD-AMC) (Alexis Biochemicals). La escisión del sustrato de caspasa-3 se verificó usando un lector de fluorescencia de placas a longitudes de onda de excitación/emisión de 355/460 nm. Se obtuvieron los resultados siguientes, en porcentaje: BSO(500 μ M) = 100,00 \pm 6,62, BSO (500 μ M) + AZA (300 μ M)= 92,79 \pm 6,09. Y como control positivo de actividad caspasa-3, se incubaron las células HepG2 con TNF- α (35 pM)+ Actinomicina D (0,8 μ M) obteniendo un resultado de 143.00 \pm 5.77 (P<0.05) con respecto al control en presencia de BSO (500 μ M). Por lo tanto, el tratamiento combinado BSO (500 μ M) + AZA (300 μ M) no activó la caspasa-3

15

20

25

Ejemplo 6: Experimento de inhibición del crecimiento de tumores in vivo

Los resultados obtenidos in vitro se completaron con estudios in vivo en un modelo de xenoinjerto. Para ello, en ratones desnudos (nude mice) se inocularon subcutáneamente 10^7 células HepG2 de hepatoblastoma humano. Después de la formación del tumor sólido (es decir, cuando el volumen del tumor alcanzaba 100 mm^3), los ratones desnudos que tenían tumor se alocaron de manera aleatoria en cuatro grupos experimentales, cada uno con ocho ratones. Estos grupos se trataron

35

mediante inyección peritumoral con 0,1 ml de DMSO (5%), BSO (90 mg/kg/día), AZA (6 mg/kg/día) y BSO (90 mg/kg/día) + AZA (6 mg/kg/día), respectivamente. Los tratamientos tanto con DMSO como con BSO se administraron todos los días hasta un total de 12 días. El tratamiento con AZA se administró en días alternos. El tamaño del tumor se midió todos los días. Al final del experimento, todos los animales fueron sacrificados. Además, también se determinaron los niveles plasmáticos de creatina quinasa (CK), alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) en los cuatro grupos de ratones, siguiendo los procedimientos indicados por el fabricante (Spinreact). El análisis estadístico se realizó usando el paquete GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores se presentan como media \pm SEM y se evaluaron mediante una prueba estadística. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0.05$. Los resultados mostraron que sólo la combinación de AZA más BSO produjo una reducción significativa del volumen del tumor con respecto a animales tratados con DMSO (figuras 10 y 11). El tratamiento con AZA más BSO produjo una disminución en los niveles de GSH en el tumor con respecto a tumores correspondientes de animales tratados con DMSO (figura 12). Sin embargo, el tratamiento con AZA más BSO no producía un incremento significativo de enzimas ALT, AST y CK en el plasma con respecto a animales tratados con AZA (figuras 13, 14 y 15), indicando que la asociación AZA plus BSO no da lugar a un aumento de la toxicidad propia a la AZA.

Ejemplo 7: Composición farmacéutica

La composición farmacéutica fue preparada diluyendo en primer lugar 2 mg/kg de AZA en el mínimo volumen de DMSO. A continuación, la dilución anterior se emulsionó junto con 90 mg/kg de BSO en Intralipid® 10%.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en que dicho tumor refractario es un cáncer.
3. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es un blastoma.
4. Uso según la reivindicación 3, en que dicho blastoma es un hepatoblastoma
5. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es un carcinoma.
6. Uso según la reivindicación 5, en que dicho carcinoma es un carcinoma hepático.
- 10 7. Uso según la reivindicación 5, en que dicho carcinoma es un carcinoma de colon.
8. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es una metástasis de un carcinoma de colon.
9. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es una metástasis de un cáncer primario de hígado.
- 15 10. Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno.
- 20 11. Uso de azatioprina o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con L-butionina-[S,R]-sulfoximina o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 25 12. Uso de L-butionina-[S,R]-sulfoximina o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con azatioprina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

13. Composición farmacéutica que comprende la combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 13, para el tratamiento de un tumor refractario en un sujeto.
15. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 13 ó 14, que se administra en el tracto gastrointestinal de un sujeto.
16. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 13 ó 14, que se administra por vía endovenosa o por vía peritumoral.
- 10 17. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizada por que dicha composición es una emulsión.
18. Una composición farmacéutica según la reivindicación 17, caracterizada por que dicha emulsión es una emulsión grasa.
19. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, caracterizada por que dicho sujeto es un mamífero.
- 15 20. Una composición farmacéutica según la reivindicación 19, caracterizada por que dicho mamífero es un paciente humano.
21. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, caracterizada por que la administración de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina se realiza de forma simultánea.
- 20 22. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, caracterizada por que la administración de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina se realiza de forma separada o secuencial.
23. Kit que incluye contenedores separados que contienen al menos dos formulaciones farmacéuticas que comprenden azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina conjuntamente o por separado, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables e instrucciones para el uso de uno de esos componentes en conjunción con el otro componente.
- 25

24. Kit que comprende azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina aptos para su administración simultánea, separada o secuencial para el tratamiento de un tumor gastrointestinal en un sujeto.
25. Un kit según las reivindicaciones 23 ó 24, en que dicho sujeto es un paciente humano.
- 5

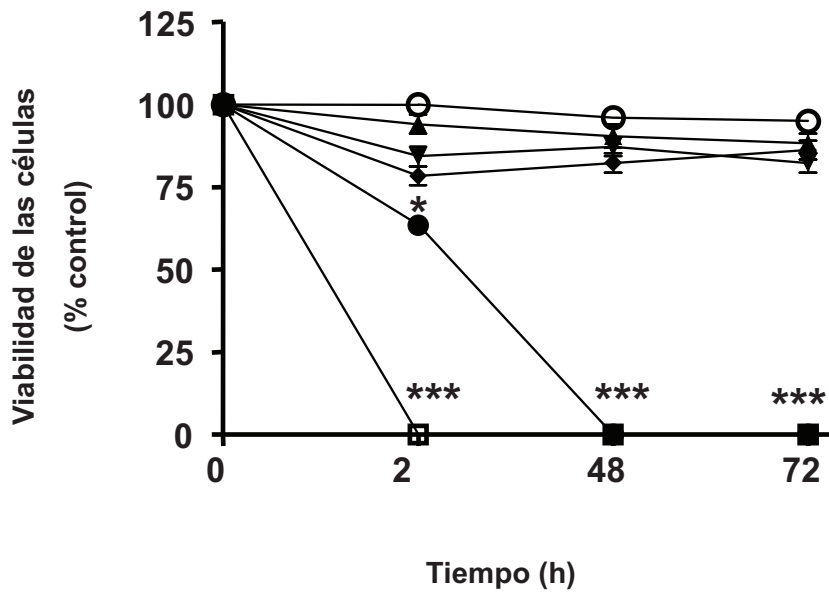


Fig. 1

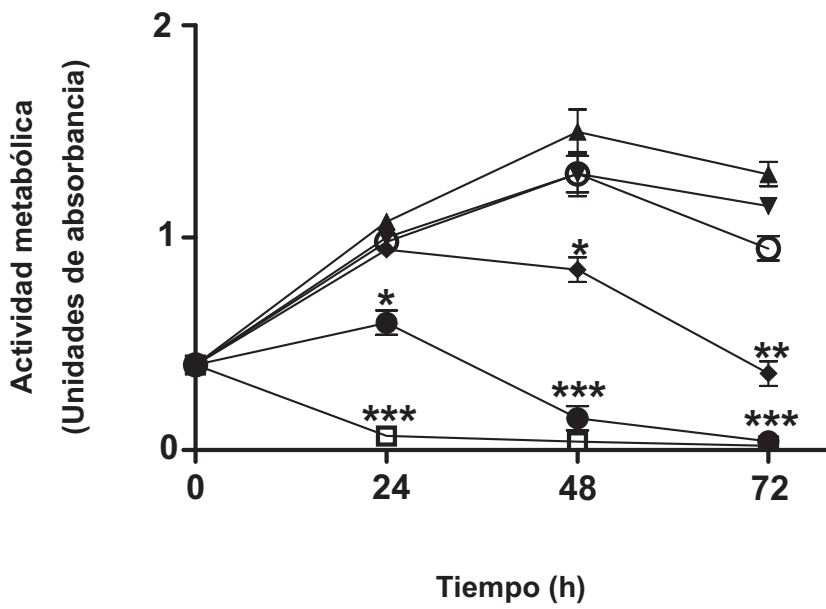


Fig. 2

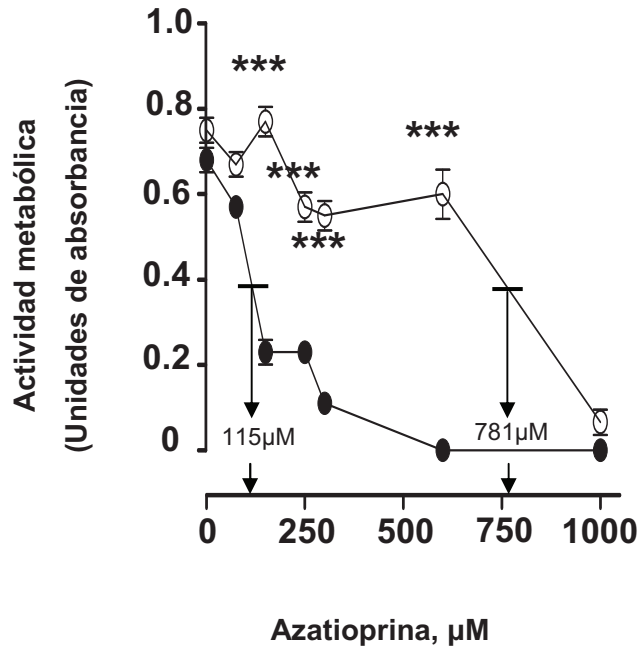


Fig. 3

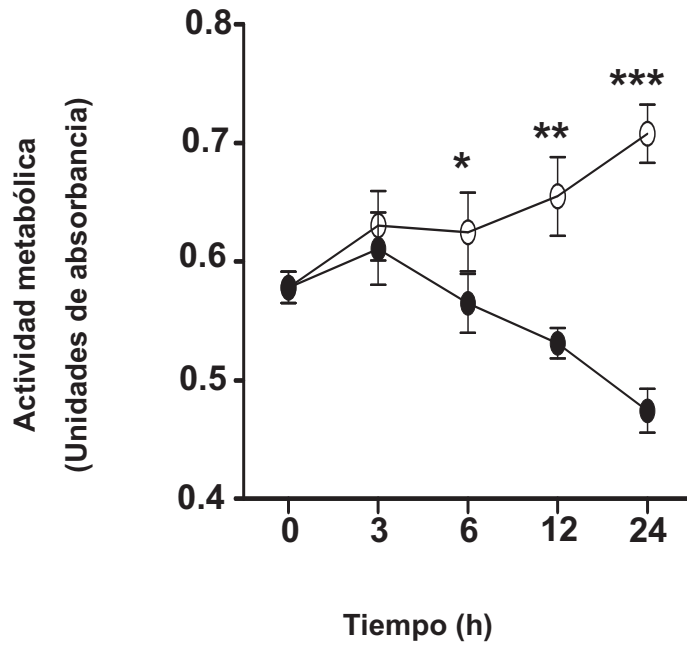


Fig. 4

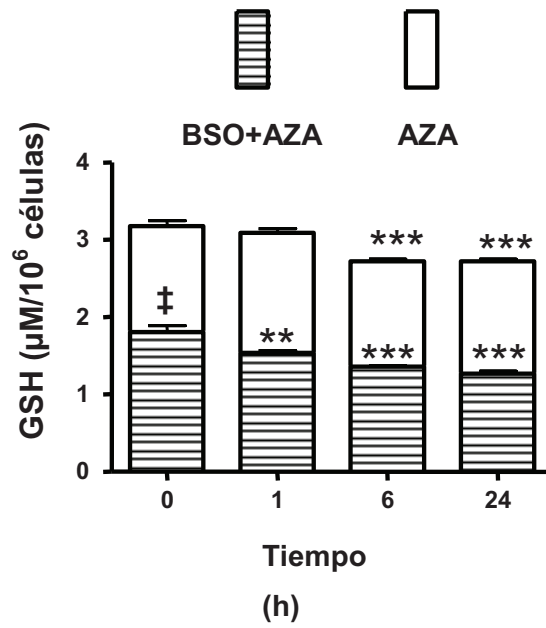


Fig. 5

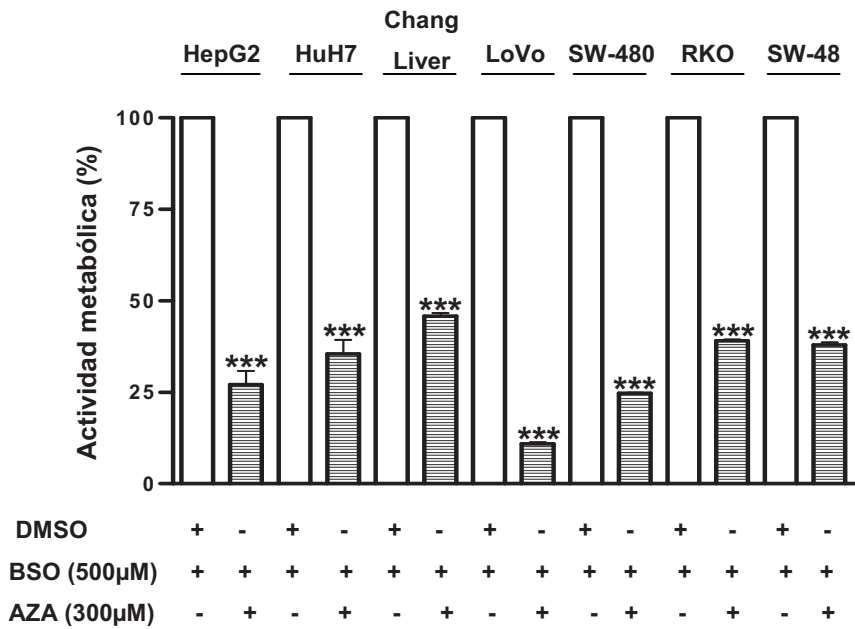
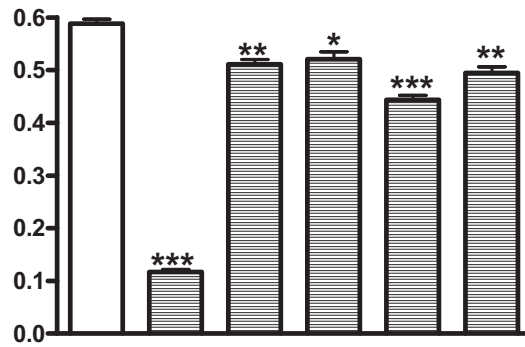


Fig. 6



DMSO	+	-	-	-	-	-
BSO(500µM)	+	+	+	+	+	+
AZA(300µM)	-	+	-	-	-	-
6-MP(300µM)	-	-	+	-	-	-
6- MMP(300µM)	-	-	-	+	-	-
6-TG(300µM)	-	-	-	-	+	-
6-MTG(300µM)	-	-	-	-	-	+

Fig. 7

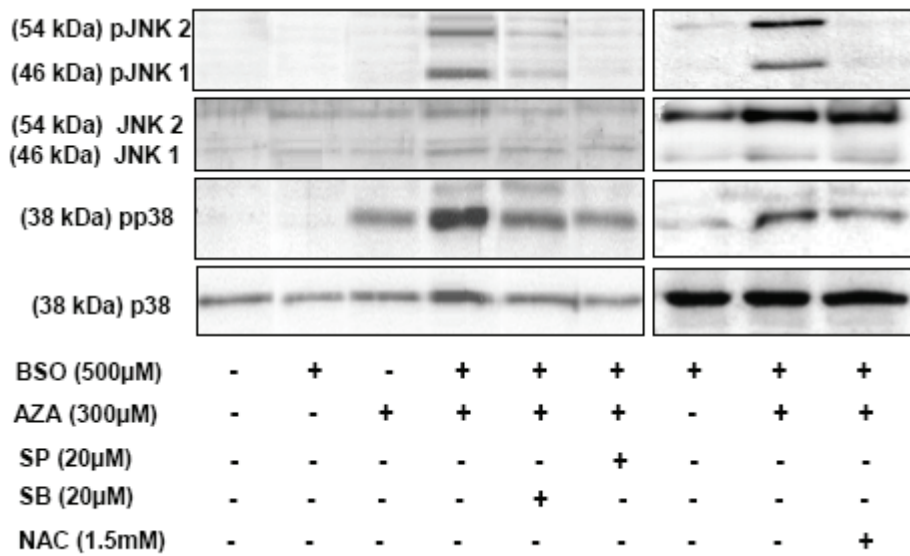


Fig. 8

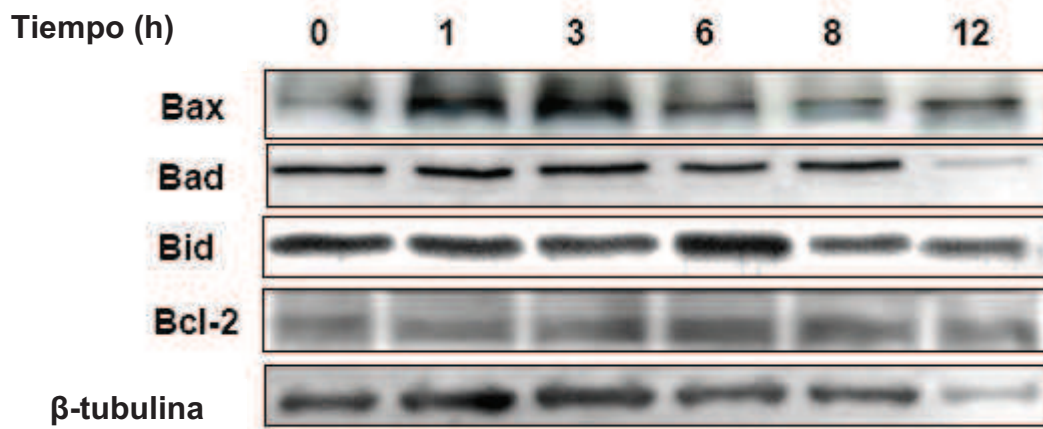


Fig. 9

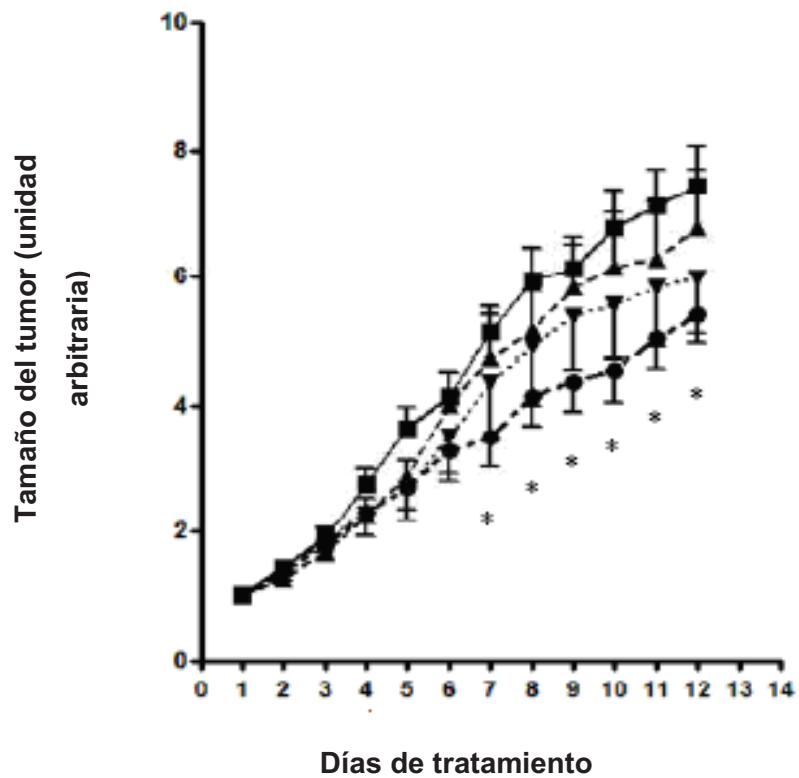


Fig. 10



Fig. 11

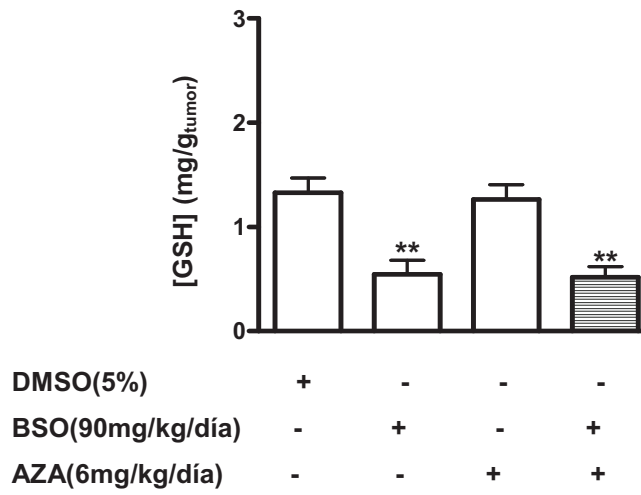


Fig. 12

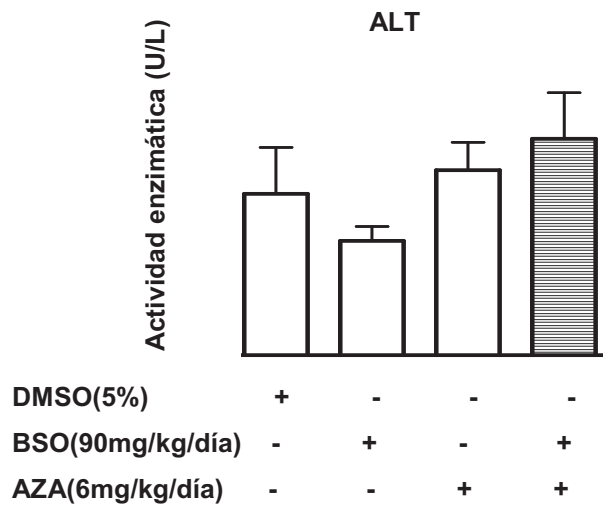


Fig. 13

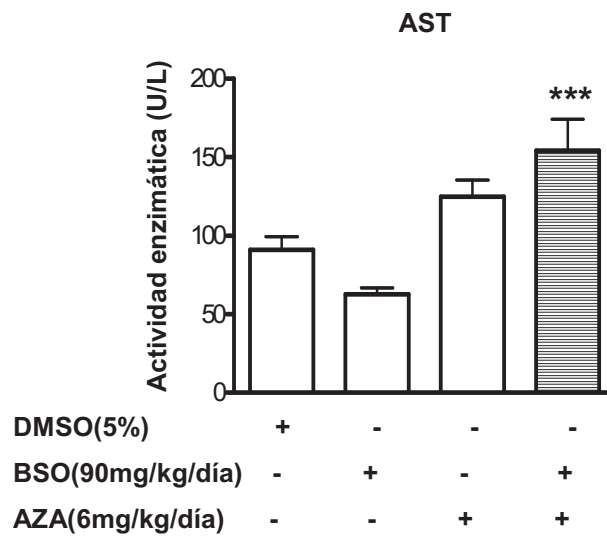


Fig. 14

Creatina Quinasa

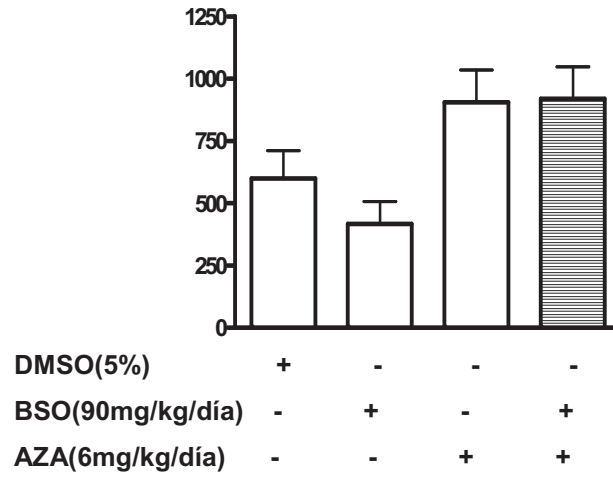


Fig. 15



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131315

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KIRKPATRICK D L. Modification of antitumor disulfide cytotoxicity by glutathione depletion in murine cells. Cancer research. 15.08.1987. ISSN 0008-5472 (Print). VOL 47(16). Pág. 4391 – 4395. Todo el document.	1-37
X	LEE A U; FARRELL G C. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. Journal of hepatology. Dic. 2001. ISSN 0168-8278 (Print). VOL 35(6). Pág. 756 – 764. Figura 3, página 759, ap.3.2.	13-24
A	ARRICK B A; NATHAN C F. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. Cancer research, Oct. 1984. ISSN 0008-5472 (Print). VOL 44 (10). Pág. 4224 – 4232. Página 4229, tabla 1.	1-37

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
20.04.2012

Examinador
M. Á. Martín-Falquina Garre

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/52 (2006.01)

A61K31/198 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12, 25-37	SI
	Reivindicaciones 13-24	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12, 25-37	SI
	Reivindicaciones 13-24	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KIRKPATRICK D L. Modification of antitumor disulfide cytotoxicity by glutathione depletion in murine cells. Cancer research. 15.08.1987. ISSN 0008-5472 (Print). VOL 47(16). Pág. 4391 – 4395. Todo el documento	15.08.1987
D02	LEE A U; FARRELL G C. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. Journal of hepatology. Dic. 2001. ISSN 0168-8278 (Print). VOL 35(6). Pág. 756 – 764. Figura 3, página 759, ap.3.2	00.12.2001
D03	ARRICK B A; NATHAN C F. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. Cancer research, Oct. 1984. ISSN 0008-5472 (Print). VOL 44 (10). Pág. 4224 – 4232. Página 4229, tabla 1	00.10.1984

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**Reivindicación 1:**

El documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano en relación con la reivindicación 1. Divulga el uso de L-butionina-R-S-sulfoximina (BSO) en combinación con derivados de 6-mercaptopurina con el fin de incrementar la toxicidad de estos últimos en células tumorales murinas EMT6 resistentes a quimioterapia (ver página 4391, columna 2, párrafo 3 y figura 2). Sin embargo, este documento no se refiere concretamente a azatioprina (AZA) por lo que la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad según el art. 6 de la Ley 11/1986. Además, de acuerdo con lo que menciona D01 en la página 4392, columna 2, párrafo 2, no todos los derivados de 6-mercaptopurina ensayados responden al tratamiento con BSO con un incremento de la actividad antitumoral. Por lo tanto, no existe en D01 ninguna sugerencia que induzca al experto en la materia a utilizar una combinación de AZA y BSO en el sentido de la reivindicación 1 y también cumple el requisito de actividad inventiva según el art. 8 de la Ley 11/1986.

El documento D03 plantea que puedan producirse in vivo interacciones terapéuticas (sinergias o reversión de resistencias) cuando se combina BSO con otros agentes antineoplásicos, AZA entre otros (ver tabla 1 y página 4229, col 2). Sin embargo, no puede considerarse que el uso de la combinación AZA y BSO en terapia contra tumores refractarios esté específicamente divulgado ni que los efectos a que se refiere la invención sean previsibles para el experto en la materia a partir de D03. En consecuencia, la reivindicación 1 también es nueva e inventiva en relación con D03.

Reivindicaciones 2-10, 11 y 12:

Las reivindicaciones 2-10, en tanto que son dependientes de la reivindicación 1, también satisfacen los requisitos de novedad y actividad inventiva (arts. 6 y 8, Ley11/1986), así como las reivindicaciones 11 y 12 a las que se aplica el mismo razonamiento utilizado en el caso de la reivindicación 1.

Reivindicaciones 13-24:

Las reivindicaciones 13 a 24 se han interpretado en el sentido que establecen las Directrices de Examen de Solicitudes de Patente de la OEPM (pág. 150-151) como reivindicaciones de producto "adecuado para...". En consecuencia, la combinación de AZA y BSO de las reivindicaciones 13 a 22 se considera anticipada por D02 (ver figura 3 y apartado 3.2 en la página 759). Según el mismo razonamiento, las reivindicaciones 23 y 24 también están anticipadas por D02 y no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (arts. 6 y 8, Ley11/1986).

Reivindicaciones 25-34:

Ninguno de los documentos del estado de la técnica disponible divulga la composición farmacéutica a que se refieren las reivindicaciones 25-34. La combinación BSO-AZA divulgada en D02 no se encuentra en forma de composición farmacéutica ya que sus efectos se prueba "in vitro". Por otra parte, D03 sí menciona la posibilidad de que la manipulación del metabolismo de glutathione mediante BSO podría producir efectos sinérgicos en terapia combinada con otros antitumorales y cita AZA entre otros. Sin embargo, se trata de una hipótesis planteada por los autores que no aporta suficiente información como para que un experto en la materia considere la realización de una composición farmacéutica de ambos compuestos tal y como lo hacen las reivindicaciones 25-34. Por lo tanto dichas reivindicaciones 25-34 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (arts. 6 y 8, Ley11/1986).

Reivindicaciones 35-37:

Ninguno de los documentos del estado de la técnica disponible divulga ni siquiera insinúa un kit como el reivindicado en las reivindicaciones 35 a 37, por lo tanto dichas reivindicaciones cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (arts. 6 y 8, LP11/1986).