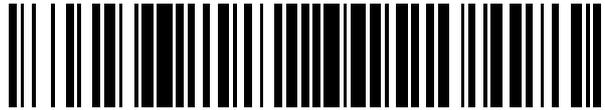


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 890**

51 Int. Cl.:

A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/336 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/31 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2007 E 07747360 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2007370**

54 Título: **Nueva composición para el control del crecimiento tumoral**

30 Prioridad:

31.03.2006 WO PCT/NL2006/000165

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

27.02.2014

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

HOFLAND, LEENDERT JOHANNES

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 444 890 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

Nueva composición para el control del crecimiento tumoral

La invención se refiere al campo del cáncer, más específicamente al tratamiento de los tumores, más específicamente al tratamiento de los tumores que expresan una somatostatina y/o un receptor de dopamina.

5 En la células de los mamíferos, aproximadamente del 35 al 5% de los restos de citosina del ADN genómico están presentes como 5-metilcitosina (Ehrlich et al., 1982, *Nucl. Acids Res.* 10: 2709-2721). Esta modificación de la citosina tiene lugar después de la replicación del ADN y está catalizada por la ADN metiltransferasa con la S-adenosil-metionina de donante del metilo. De aproximadamente el 70 al 80% de los restos de 5-metilcitosina se encuentran en la secuencia CpG (Bird, 1986, *Nature* 321: 209-213). Esta secuencia, cuando se encuentra con alta frecuencia en el genoma, se denomina islotes CpG. Los islotes CpG sin metilar están asociados a genes de mantenimiento, mientras que los islotes de muchos genes específicos de tejido están metilados, excepto en el tejido en el que se expresan (Yevin y Razin, 1993, en «DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance». Birkhauser Verlag, Basilea, págs. 523-568). Se ha propuesto que esta metilación del ADN desempeña una función importante durante el desarrollo embrionario a la hora de controlar la expresión de diferentes genes en las células eucariotas. En concordancia con esta hipótesis, se ha hallado que la inhibición de la metilación del ADN induce la diferenciación de las células de los mamíferos (Jones y Taylor, 1980, *Cell* 20: 85-93).

La metilación del ADN en la región reguladora de un gen puede inhibir la transcripción del gen. Probablemente, esto está ocasionado por la intrusión de la 5-metilcitosina en el surco mayor de la hélice del ADN, lo que interfiere con la fijación de los factores de transcripción.

20 Cuando se compara un cáncer con el tejido normal, aparecen con frecuencia tres cambios principales en la metilación del ADN. En primer lugar, las células cancerosas muestran un genoma muy hipometilado, lo que se ha asociado con inestabilidades cromosómicas (Eden et al., 2003, *Science* 300: 455; Gaudet et al., 2003, *Science* 300: 489-492), así como la activación de los elementos del ADN repetitivo que suelen estar silenciados (Walsh et al., 1998, *Nat. Genet.* 20, 116-117).

25 En segundo lugar, se puede producir la metilación *de novo* de los islotes CpG a lo largo del desarrollo tumoral. Se estima que en los tumores hay de media 600 islotes CpG metilados de manera aberrante en comparación con el tejido normal, aunque esto puede variar enormemente entre tipos tumorales y dentro de subtipos histopatológicos concretos. Además, la metilación no se produce de manera aleatoria, ya que hay islotes CpG que están metilados en muchos tipos de tumores, mientras que otros islotes CpG están metilados únicamente en determinados tipos de tumores (Costello, J. F, et al, 2000, *Nat. Genet.* 24: 132-138; Esteller, M., Herman, J. G., 2002, *J. Pathol.* 196: 1-7). Esto concuerda con un modelo en el cual la metilación de los islotes CpG en determinados genes daría a la célula cancerosa una ventaja de crecimiento o de supervivencia y, por tanto, los patrones de metilación emergen según la presión selectiva para el silenciamiento del gen en el tipo de tumor examinado.

35 En tercer lugar, la citosina metilada en el ADN, la 5-metilcitosina, puede sufrir la desaminación espontánea para formar timina a una velocidad mucho más alta que la desaminación de la citosina en uracilo (Shen et al., 1994, *Nucl. Acids Res.* 22: 972-976). Si no se repara la desaminación de la 5-metilcitosina, dará lugar a una mutación por transición de C a T. Esto se puede encontrar en la región codificante, pero muchos genes supresores de tumores también pueden estar inactivados por la metilación aberrante de los islotes CpG de su región promotora. No están claros los mecanismos moleculares mediante los cuales tiene lugar la metilación aberrante del ADN durante la carcinogénesis. Es posible que la ADN metiltransferasa se equivoque al metilar los islotes CpG de la hebra naciente del ADN cuando no hay CpG complementario en la hebra madre. También es posible que la metilación aberrante se pueda deber a la retirada de las proteínas que se fijan a CpG para impedir la metilación de estos sitios. Sea cual sea el mecanismo, la frecuencia de metilación aberrante es un fenómeno raro en las células normales de los mamíferos.

45 Basándose en lo anterior, se ha propuesto que los compuestos que inhiben la metilación, tales como los derivados de la 2'-desoxicitidina (5-aza-2'-desoxicitidina (DAC, decitabina), 5-azacitidina (5-azaC), arabinosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC)), tienen propiedades antitumorales, ya que pueden activar la expresión de genes silenciados epigenéticamente, entre ellos los genes supresores de tumores. Además, estos desmetilantes pueden restaurar la sensibilidad a una serie de quimioterápicos, entre ellos cisplatino, epirrubicina y temolozomida (Plumb, J. A. et al., 2000, *Cancer Res.* 60: 6039-6044; Strathdee, G. et al., 1999, *Oncogene* 18: 2335-2341). Al igual que otros muchos tratamientos nuevos que actualmente se han desarrollado contra dianas específicas, se prevé que los desmetilantes inhiban el crecimiento tumoral por la reversión específica de la represión del supresor tumoral y los genes del ciclo celular que están metilados de manera aberrante en las células tumorales y, por lo tanto, tienen menos efectos secundarios que la quimioterapia convencional inespecífica (Issa, J. P., 2003, *Curr. Opin. Oncol.* 15: 446-451). Se ha descrito *in vitro* e *in vivo* la citotoxicidad sinérgica de la decitabina y de una amplia gama de agentes citotóxicos clínicamente importantes, entre ellos amsacrina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, epirrubicina, idaurubicina, interferón α , ácido retinoico, topotecán y temozolomida (Frost, P. et al., 1990, *Cancer Res.* 50: 4572-4577; Kritz et al., 1996, *Am. J. Hematol.* 51(2): resumen; Colombo et al., 1986 *Cancer Treat. Rep.* 70(12): resumen; Momparler, R. L. et al., 1990, *Cancer Lett.* 54: 21-28; Anzai et al., 1992, *Cancer Res.* 52(8): resumen; Dore et al., 1992, *Anticancer Drugs* 3(3): resumen; Schwartzmann et al., 1997, *Leukemia* 11(Supl.

1): resumen; Willemze et al., 1997, *Leukemia* 11(Supl. 1): resumen; Plumb et al., véase más arriba). En Rubinfeld, J. et al. (patente internacional WO 2002/067681) se ha reivindicado una politerapia con desmetilantes y todas las sustancias farmacéuticas antitumorales conocidas, pero no ha sido demostrado.

5 El silenciamiento epigenético también se puede inhibir mediante el bloqueo de las histona desacetilasas (HDAC) a través de los inhibidores de la desacetilación de las histonas (inhibidores de las HDAC). A continuación de la metilación de los restos de citosina en el ADN, como se describió anteriormente, la retirada de los grupos acetilo es un mecanismo clave para el silenciamiento génico.

10 El depósito de histonas a lo largo del ciclo celular mediante un procedimiento independiente de la replicación implica que se desmontan los nucleosomas que ya existían, y que se han liberado sus histonas. Se sabe que el proceso de la transcripción da lugar a un desplegamiento local de la fibra de cromatina y a una configuración «abierta» de la cromatina. Aunque la transcripción de las plantillas nucleosómicas con las polimerasas bacterianas se puede producir *in vitro* sin desplazar los octámeros de histonas del ADN, los ensayos *in vivo* demostraron que en los núcleos eucariotas hay una cantidad medible de desplazamiento de histonas dependiente de la transcripción. De hecho, incluso *in vitro*, la ARN polimerasa II es virtualmente incapaz de transcribir el ADN nucleosómico en las condiciones fisiológicas. La transcripción requiere que los contactos entre las histonas y el ADN se rompan para que la polimerasa recorra el ADN nucleosómico. Aunque la transcripción se puede producir sin el desplazamiento de las histonas si el octámero de histonas libera algunos de sus contactos con el ADN y mantiene otros, todos los contactos se tendrían que liberar con cierta frecuencia. A continuación, simplemente se disminuiría el octámero de histonas. Aún más, a medida que actúan los factores de remodelación localizados, alterarían la estructura del nucleosoma. Las observaciones *in vitro* e *in vivo* se pueden reconciliar si el desplazamiento de las histonas se produce de vez en cuando a medida que se desmontan los nucleosomas. Las restricciones de los nucleosomas en una fibra compactada de cromatina (a saber, cromatina «cerrada») limitarían el desplazamiento de las histonas.

25 La hipoacetilación, en concreto de las histonas H3 y H4, asociadas a los dominios heterocromáticos de un abanico de organismos, ha sido estudiada con gran detalle en *Saccharomyces cerevisiae*. Se han identificado muchos de los factores que actúan *in cis* y *in trans* que se necesitan para establecer y mantener el estado silencioso de los telómeros y de los locus HML/HMR. Estos estudios han demostrado que se necesita la hipoacetilación de las histonas. El silenciamiento está mediado por el complejo multiproteico SIR₍₁₋₄₎ que se fija al nucleosoma, reclutado por la interacción con proteínas específicas que se fijan al ADN. Sir3 y Sir4 interactúan específicamente con la cola del extremo amino de las histonas H3 y H4 en el estado hipoacetilado. Aunque la cola del extremo amino de las histonas no se necesita individualmente para el crecimiento de la levadura, desempeña una función esencial en el silenciamiento, para lo que se necesitan los aminoácidos 4 a 20 de H3 y 16 a 29 de H4. Determinados alelos de sir3 pueden suprimir la ausencia de silenciamiento de las mutaciones de la cola de la histona H4, y Sir3 y Sir4 pueden fijarse *in vitro* al extremo amino de las histonas H3 y H4, lo que sugiere la interacción directa. Los últimos estudios con anticuerpos contra diferentes isoformas acetiladas de las histonas indican que las histonas de la heterocromatina telomérica y de HML/HMR están hipoacetiladas en todos los sitios modificables.

40 Los inhibidores de las HDAC actúan sobre la acetilación de las histonas durante las primeras 24 horas tras añadir el fármaco al cultivo celular, el cual suele alcanzar su máximo a las primeras 16 horas (el tiempo exacto depende de la línea celular, del compuesto, etc.). Este efecto se puede revertir haciendo crecer las células en medio nuevo sin ningún fármaco. Los cambios del perfil de expresión génica también aparecen durante las primeras 24 horas de tratamiento, cuando las histonas empiezan a hiperacetilarse. Todos los inhibidores de las HDAC provocan un incremento de la cantidad de ARNm y de proteína de p21WAF1, el inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas, así como la parada del ciclo celular. Aunque actúan mediante mecanismos parecidos (p. ej., bloqueando el acceso de los restos de acetil-lisina al bolsillo catalítico de la HDAC, que está muy conservado en todas las HDAC), estas sustancias tienen efectos notablemente diferentes: se encuentran diferentes patrones de expresión génica cuando se observa la acción de varios compuestos en la misma línea celular y la parada del ciclo celular se puede producir en G2/M (lo más frecuente) o en G/S.

55 En los tumores neuroendocrinos, así como en los tumores epiteliales indiferenciados, tales como los carcinomas de mama, próstata y colon, los receptores de somatostatina y/o dopamina se expresan en la superficie de las células tumorales (Reubi, J. C. y Landolt, A. M., 1989, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68: 844-850; Chanson, P. et al., 1993, *Ann. Intern. Med.* 119: 236-240; De Bruin, T. W. A., 1992, *J. Clin. Endocrinol. Met.* 75: 1310-1317; De Herder, W. W., 1994, *Am. J. Med.* 96: 305-312; Reubi, J. C. et al., 1990, *Metabolism* 39(Supl. 2): 78-81; Lamberts, S. W. J., 1991, *Endocr. Rev.* 12: 450-482; Lemmer, K. et al., 2002, *Life Sci.* 71: 667-678). En los pacientes con tumores que expresan el receptor de somatostatina y/o dopamina, estos receptores acoplados a proteínas G formarían una diana para el tratamiento con los análogos de la somatostatina y/o agonistas de la dopamina, respectivamente, ya que inhibirían la producción de las hormonas y de los péptidos bioactivos en las células tumorales, lo que da lugar a que se controlen mejor los síntomas clínicos graves acompañantes. Aunque los análogos de la somatostatina y los agonistas de la dopamina inhiben el crecimiento de las células tumorales en una serie de modelos experimentales (Lamberts et al., 1991, véase más arriba; Schally, A. V., 1988, *Cancer Res.* 48: 6977-6985; Lamberts, S. J. W. et al., 1996, *New. Eng. J. Med.* 334: 246-254), no se observa tal efecto inhibitor del crecimiento tumoral, o sólo se observa muy rara vez, desde el punto de vista clínico (Hejna, M. et al., 2002, «The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?» *Annals of Oncology* 13: 653-668). Si hay algún efecto, un agonista de la dopamina provoca principalmente la regresión tumoral mediante la inhibición de la síntesis de las proteínas y la

disminución del volumen celular (McNichol, A. M. et al., 2005, *Acta Neurochir.* 147(7): 2005-2007). Se ha descrito que los análogos de la somatostatina provocan la regresión de los tumores en la glándula hipofisaria que sintetizan hormona del crecimiento (patente internacional WO 00/75186; patente de los Estados Unidos US 5.538.739), pero sin embargo, el cese del tratamiento conduce con frecuencia a un incremento rápido del volumen tumoral, lo que le niega un posible efecto inhibitor del crecimiento. Se han dado varias razones posibles por las que los análogos de la somatostatina no son eficaces en los humanos (Lamberts, S. W. J. et al., 2002, *Trends Endocrinol. Metabol.* 13: 451-457): (i) la mayoría de los cánceres humanos comprenden una mezcla de tejido estromático y diferentes clones de células tumorales epiteliales que no expresan de manera uniforme los receptores de la somatostatina (sst). Esto contrasta radicalmente con la mayoría de modelos tumorales monoclonales en los animales, que, en la mayoría de los casos, expresan homogéneamente el sst en todas las células tumorales; (ii) la expresión del sst en regiones del cáncer humano de mama, de próstata y de colon a menudo indica una pérdida de diferenciación de los tumores. En general, estos tumores indiferenciados con diferenciación celular neuroendocrinológica tienen un mal pronóstico en esa etapa del desarrollo; (iii) debido a la naturaleza de los nuevos ensayos clínicos en oncología, a menudo sucede que se incluyen en estos estudios principalmente los pacientes que tienen una enfermedad avanzada. Además, hay indicios preliminares de que la quimioterapia previa podría disminuir el número de sst; y (iv) sigue sin estar claro si los análogos específicos de sst₂ aplicados en los ensayos clínicos hasta ahora son los mejores compuestos que se podrían utilizar.

La patente de los EE.UU. US 2005/148500 A1 se refiere a las composiciones de proteínas que incrementan la cantidad de dopamina en las neuronas, y contiene procedimientos para tratar las afecciones ocasionadas por la falta de dopamina y/o la pérdida de las neuronas DA o la lesión de las neuronas DA.

La patente internacional WO 02/067681 A1 se refiere a las composiciones y los procedimientos para tratar las enfermedades relacionadas con la proliferación celular anormal, tal como el cáncer, en donde los procedimientos comprenden el uso de un inhibidor de la metilación del ADN en politerapia con un antineoplásico cuya actividad antineoplásica *in vivo* se ve afectada de manera adversa por la metilación aberrante del ADN .

La patente internacional WO 00/75186 A1 se refiere a la neuromedina B y a los agonistas del receptor de la somatostatina.

La patente de los EE.UU. US 2006/069060 A1 se refiere a las sales de la decitabina, a los procedimientos para sintetizar las sales, y a los usos de los mismos.

La patente de los EE.UU. US-A-5.538.739 se refiere a micropartículas que comprenden octreotida, en una matriz polimérica específica.

McNichol A. M. et al. (2005) «Clinical and histological correlations in prolactinomas - Comments» *Acta Neurochirurgica* 147: 757-758 se refiere a las correlaciones clinicopatológicas en una serie de prolactinomas, que examinan las relaciones entre los signos histopatológicos de la agresividad y los indicios clínicos de invasión o de resistencia al agonista de la dopamina, la bromocriptina (BRC).

Eyal O. et al. (2005) *Acta Paediatrica* 94: 1852-1854 describe un caso de macroprolactinoma y el aumento del factor de crecimiento insulínico de tipo I en un chico joven.

Perez-Alvarez R. et al. (2005) *Journal of Viral Hepatitis* 9: 75-79 presenta un caso clínico de sarcoidosis en dos pacientes con hepatitis C crónica tratada con interferón, ribavirina y amantadina.

La patente europea EP 1.477.165 A2 se refiere al uso de un agonista de la síntesis de la tetrahidrobiopterina para tratar la inflamación, en particular dermatitis de contacto, artritis reumatoide y rechazo del aloinjerto provocado por la sobreproducción de óxido nítrico en las células inmunitarias.

La patente europea EP 0.266.665 A2 se refiere al tratamiento de las artropatías inflamatorias con somatostatina.

La patente europea EP 1.547.617 A1 se refiere a un fármaco para inhibir la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular, que comprende un compuesto que inhibe las histona desacetilasas, y el uso del mismo para tratar las enfermedades o afecciones en las que interviene la degradación y la degeneración de la matriz extracelular del cartílago articular.

La patente de los EE.UU. US 2004/109846 A1 se refiere a composiciones y a procedimientos para tratar las enfermedades relacionadas con la proliferación celular anormal, tal como el cáncer, en donde los procedimientos comprenden el uso de un inhibidor de la metilación del ADN en combinación con un antineoplásico cuya actividad como un antineoplásico *in vivo* se ve afectada de manera adversa por la metilación aberrante del ADN.

La patente de Gran Bretaña GB-A-2.351.733 se refiere a los agonistas no peptídicos de la somatostatina, y al uso de los mismos en tratamiento.

La patente internacional WO 2005/039498 A2 se refiere a los procedimientos para tratar los cánceres mediante inhibidores de las histona desacetilasas (HDAC).

La patente internacional WO 2005/066151 A2 se refiere a determinados inhibidores de las histona desacetilasas (HDAC).

La patente internacional WO 98/16208 A se refiere a una composición para tratar la enfermedad de Parkinson que comprende un éster alquílico de levodopa en un solvente que permite la administración transdérmica de la levodopa.

- 5 La patente internacional WO 2005/023179 A2 se refiere a un procedimiento para tratar el cáncer, mediante la administración de inhibidor de las histona desacetilasas o una sal farmacéuticamente aceptable o un hidrato del mismo en un primer procedimiento de tratamiento, y una segunda cantidad de un fármaco contra el cáncer en un segundo procedimiento de tratamiento.

- 10 Donangelo, Ines & Melmed, Shlomo (2005) *Endocrine* 28: 123-128 presenta una explicación del tratamiento médico de los adenomas que secretan la GH.

Gruszka A. et al. (2006) *Life Sciences* 78: 689-693 examina el efecto de los agonistas selectivos de los receptores de la somatostatina sst1, sst2 y sst5, una quimera de somatostatina y dopamina (SST/DA) y bromocriptina en adenomas hipofisarios *in vitro* «que no funcionan desde el punto de vista clínico».

Compendio de la invención

- 15 Los inventores ahora han hallado, sorprendentemente, que una politerapia con un análogo de la somatostatina, un agonista de la dopamina o una molécula quimérica de somatostatina-dopamina (que se dirige al receptor de la somatostatina y de la dopamina D2 simultáneamente) con un desmetilante supera los problemas de la eficacia terapéutica de las monoterapias con análogos de la somatostatina y/o agonistas de la dopamina, y que el
20 tratamiento politerápico con un análogo de la somatostatina, un agonista de la dopamina o una molécula quimérica de somatostatina-dopamina con un desmetilante proporciona un tratamiento eficaz contra los tumores que expresan los receptores de la somatostatina y/o de la dopamina, respectivamente. Ya que el silenciamiento epigenético está ocasionado no sólo por la metilación del ADN, sino también por la desacetilación de las histonas, se contemplan efectos sinérgicos comparables con una politerapia de un inhibidor de las HDAC con un análogo de la somatostatina y/o agonista de la dopamina, o con una molécula quimérica de somatostatina-dopamina.

- 25 Por lo tanto, la invención comprende una composición farmacéutica que comprende al menos un desmetilante y al menos un agonista de la dopamina, en donde el al menos un desmetilante se selecciona del grupo que consiste en 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC, decitabina), 5-azacitidina (5-azaC), arabinosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC); y el al menos un agonista de la dopamina se selecciona del grupo que consiste en amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol, pramiprexol, rasagilina, BIM23A387, BIM-
30 23A758, BIM-23A760, BIM-232A761 y BIM-23A765.

La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente al menos un inhibidor de las HDAC seleccionado del grupo que consiste en ácidos hidroxamínicos, ácidos carboxílicos, benzamidas, epóxidos, FK228, apicidina A, B y C.

- 35 La composición farmacéutica puede comprender el al menos un desmetilante, el al menos un inhibidor de las HDAC, al menos un análogo de la somatostatina seleccionado del grupo que consiste en somatostatina 14, somatostatina 28, cortistatina 14, cortistatina 17, cortistatina 29, octreotida, vapreotida, lanreotida, CH275, CH-288, BIM-23056, BIM-23206, BIM-23268, BIM-23926, BIM-23052, BIM-23244, BIM-23A758, BIM-23A760, BIM-232A761, BIM-23A765, L- y D-Tyr(8)CYN 154806, L-779.976, L-803.087, L-817.818, BIM-23A387, SOM-320 y KE-108, y el al menos un agonista de la dopamina.

- 40 En un aspecto, el desmetilante es la 5-aza-2'-desoxicitidina y el agonista de la dopamina es la cabergolina. En un aspecto, el desmetilante es la 5-aza-2'-desoxicitidina y el al menos un agonista de la dopamina es la quimera de somatostatina-dopamina BIM-23A765.

La invención también da a conocer una composición farmacéutica como se define más arriba para el uso en el tratamiento de un tumor que expresa los receptores de la dopamina en su superficie.

- 45 La invención también da a conocer una composición farmacéutica que comprende 5-aza-2'-desoxicitidina y octreotida, y una composición farmacéutica que comprende 5-aza-2'-desoxicitidina y BIM-23926 o BIM-23206.

La invención da a conocer adicionalmente una composición farmacéutica como se define más arriba para el uso en el tratamiento de un tumor.

Descripción de las figuras

- 50 Fig. 1. En el panel A se muestran los efectos de AZA (decitabina), octreotida y una combinación de ambas sobre la proliferación celular en las células de tumor carcinoide BON humanas. En el panel B se muestran los efectos de estos compuestos sobre la fragmentación del ADN (apoptosis) en las células BON.

Fig. 2. Lo mismo que en la figura 1 para la AZA y la cabergolina.

Fig. 3. Efecto sinérgico de la AZA (a 5 nM) y de los análogos de la somatostatina BIM23926 (selectivo de sst1) y BIM 23206 (selectivo de sst5) (ambos a 10 nM) sobre la fragmentación del ADN de las células carcinoides BON humanas. Los valores representan la media de 2 experimentos independientes.

5 Fig. 4. Efecto sinérgico de la AZA (a 5 nM) y la quimera de somatostatina-dopamina BIM 23A765 (a 10 nM; agonista selectivo de sst2 + sst5 + D2) sobre la fragmentación del ADN de las células carcinoides BON humanas. Los valores representan la media de 2 experimentos independientes.

Descripción detallada de la invención

Debido a los problemas que se describen en la parte introductoria, han fallado o no fueron tan exitosos como se esperaba los muchos intentos por utilizar los análogos de la somatostatina y/o los agonistas de la dopamina para controlar el crecimiento y el desarrollo tumoral. Una de las hipótesis que los inventores actuales han comprobado es que el fracaso a la hora de obtener el control adecuado del crecimiento tumoral con estos compuestos se debía a la hipermetilación de los genes tumorales, en especial de los genes que intervienen en el efecto inhibitor del crecimiento tumoral a través de la activación de los receptores de la somatostatina y/o de la dopamina. Por consiguiente, los inventores actuales han empezado a realizar los experimentos que se describen en el apartado experimental y han observado sorprendentemente que la politerapia con un análogo de la somatostatina y/o un agonista de la dopamina, o una molécula quimérica de somatostatina-dopamina con un desmetilante tal como la decitabina incrementa considerablemente la eficacia del análogo de la somatostatina, del agonista de la dopamina o de la molécula quimérica de somatostatina-dopamina. El potente efecto inhibitor sinérgico del crecimiento tumoral que se observa es el análogo de la somatostatina, el agonista de la dopamina o la molécula quimérica de somatostatina-dopamina. El potente efecto inhibitor sinérgico del crecimiento tumoral que se observa se cree que se debe al menos en parte a que se incrementa la fragmentación del ADN (apoptosis).

En la técnica se conocen varios desmetilantes que se pueden aplicar en la presente invención. Un grupo importante está formado por derivados de la 2'-desoxicitidina, de los cuales la 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina) es el más utilizado en la actualidad. La diferencia estructural entre la decitabina y el nucleósido natural, desoxicitidina, está en la presencia de un nitrógeno en la posición 5 del anillo de citosina en comparación con el átomo de carbono en esta posición. Se pueden diferenciar dos formas isoméricas de la decitabina, de las cuales el anómero β es la forma activa. La decitabina posee muchas características farmacológicas. A nivel molecular, solo se incorpora en el ADN en la fase S. A nivel celular, la decitabina puede inducir la diferenciación celular y ser hematológicamente tóxica. A pesar de tener una semivida *in vivo* corta, la decitabina se distribuye muy bien por el tejido.

La función más prominente de la decitabina es su capacidad para inhibir con especificidad y potencia la metilación del ADN. Dentro de la célula, la decitabina se convierte primero en su forma activa mediante la desoxicitidina cinasa que se sintetiza principalmente durante la fase S de la célula. Después de la conversión en su forma trifosfato, la decitabina se incorpora en el ADN en replicación a una velocidad similar a la del sustrato natural, el dCTP (Bouchard y Monparler, 1983, *Mol. Pharmacol.* 24: 109-114). El reemplazo de la 5-metilcitosina por la decitabina en un sitio específico de la metilación produce una inactivación irreversible de la ADN metiltransferasa, según cabe suponer debido a la formación de un enlace covalente entre la enzima y la decitabina. Al inhibir específicamente la ADN metiltransferasa, la enzima requerida para la metilación del ADN, se puede impedir la metilación aberrante de los genes tumorales.

Los investigadores también han encontrado que el tratamiento con un desmetilante incrementa la expresión de los receptores de somatostatina y de dopamina en la superficie de las células tumorales (no se muestran los datos).

En la actualidad, los inhibidores de las HDAC tanto sintéticos como de síntesis natural tienen gran interés para las compañías farmacéuticas debido a que es muy probable que se puedan usar contra el cáncer y otras enfermedades humanas. La estructura bioquímica de los inhibidores de las HDAC es muy heterogénea, desde compuestos simples, tal como el valproato, a diseños más elaborados, tales como la MS-275 (una benzamida). En total, los inhibidores de las HDAC presentan un amplio abanico de actividades contra todas las HDAC, aunque se conocen unas pocas excepciones. Estos compuestos se pueden clasificar, tal y como se describe a continuación, según su naturaleza química y el mecanismo de inhibición.

1. Ácidos hidroxámicos. Este es, probablemente, el conjunto más amplio de inhibidores de las HDAC. La estructura general de estas sustancias consiste en un conector hidrófobo que permite al resto de ácido hidroxámico atrapar el catión en el fondo del bolsillo catalítico de la HDAC, mientras que la parte voluminosa de la molécula hace de tapón para el tubo. La mayoría de las sustancias químicas de este grupo son inhibidores muy potentes (y funcionan *in vitro* a concentraciones de nanomolar a micromolar), pero reversibles, de las HDAC de clase I/II. Entre estos compuestos podemos hallar la TSA (tricostatina A), que se utiliza ampliamente de referencia para la investigación en este ámbito. Sin embargo, su toxicidad en los pacientes y la falta de especificidad por determinadas HDAC han motivado la búsqueda de otras sustancias. El diseño de muchos fármacos sintéticos se ha inspirado en la estructura de la TSA: desde la simplicidad del SAHA (ácido suberoilaniilidohidroxámico) o del Scriptaid, a los últimos fármacos desarrollados por compañías farmacéuticas tales como Novartis (Basilea, Suiza), que incluyen NVP-LAQ-82425 y PXD-101, se ha analizado (*in vitro*, *in vivo* y, en algunos casos, en ensayos clínicos) una enorme gama de combinaciones de bloques de construcción, y se ha demostrado que tienen un grado aceptable de éxito.

2. Ácidos carboxílicos. En este grupo tan sólo hay unos pocos fármacos: ácidos butanoico, valproico y 4-fenilbutanoico. A pesar de ser mucho menos potentes que los ácidos hidroxámicos (la inhibición se produce *in vitro* a concentraciones milimolares y con dosis muy altas *in vivo*) y de sus efectos pleiotrópicos, se encuentran en la actualidad entre los inhibidores de las HDAC mejor estudiados: ya se ha autorizado el uso del ácido valproico y del fenilbutirato para el tratamiento de la epilepsia y de algunos cánceres, respectivamente, mientras que el ácido butanoico (o sus formas de profármaco, tal como el pivaloiloimetilbutirato) se está sometiendo a ensayos clínicos.

3. Benzamidas. La MS-275 y algunos de sus derivados inhiben las HDAC *in vitro* a concentraciones micromolares, pero el mecanismo no se conoce con claridad. Se cree que el grupo diaminofenilo es muy importante para el comportamiento inhibitorio; probablemente, ambas funciones amino atrapan el ion metálico en el sitio catalítico. La MS-275 y la N-acetildinalina se están ensayando en estudios clínicos en curso.

4. Epóxidos. Se supone que estas sustancias químicas atrapan las HDAC a través de la reacción del resto epóxido con el catión de cinc o un aminoácido (que forma un enlace covalente) en el bolsillo de fijación. Sin embargo, la inestabilidad de la función epóxido impide que haya una actividad significativa *in vivo*, lo que las hace poco interesantes desde el punto de vista farmacológico. Los únicos inhibidores de las HDAC que hay en este conjunto de compuestos son una serie de productos naturales con actividad significativa *in vitro*, tales como depeudecina, trapoxina A, etc. Las trapoxinas son tetrapéptidos cíclicos con al menos un aminoácido no proteínogénico, y su estructura se ha utilizado de modelo para el diseño de nuevos inhibidores de las HDAC basados en el ácido hidroxámico.

5. Otros. Al igual que las benzamidas del grupo anterior, el depsipéptido FK228 (un metabolito de los hongos) también se está estudiando en ensayos clínicos en curso, pero el mecanismo mediante el cual inhibe las HDAC clásicas *in vitro* sigue sin conocerse. Una hipótesis propone que el puente disulfuro se reduce dentro de la célula u organismo y que el resto 4-mercapto-but-1-enilo encaja entonces dentro del bolsillo catalítico de las HDAC, con lo que atrapa el Zn^{2+} de un modo parecido al de otros inhibidores. En las células cultivadas, es capaz de inducir la hiperacetilación de las histonas y de parar el crecimiento a concentraciones nanomolares. La apicidina A es otro metabolito de los hongos que es capaz de inhibir las HDAC en muchos organismos, desde los protozoos a los humanos, a concentraciones micromolares. Desde el punto de vista químico, se trata de un tetrapéptido cíclico que se diferencia de la apicidina A en un único resto. De hecho, la naturaleza peptídica de las apicidinas permite que sea fácil el diseño para la síntesis química (que incluye la que emplea metodologías en fase sólida) de análogos mediante el cambio de los aminoácidos, con lo que se facilita la búsqueda de inhibidores de las HDAC más específicos y más fuertes. Las trapoxinas (véase más arriba) son también tetrapéptidos cíclicos que están muy relacionados con las apicidinas. Sin embargo, la principal diferencia entre los 2 grupos de sustancias es que el primero lleva una función epoxicetona en vez de una función alquilcetona, lo que hace que el compuesto sea mucho menos estable en las condiciones fisiológicas.

Esto probablemente significa que la hipermetilación y/o la desacetilación y, por tanto, inactivación de los genes supresores de tumores, que actúa como resultado de la activación del receptor de la somatostatina o del receptor de la dopamina, impide que se produzca la cascada normal de acontecimientos cuando se aplica la somatostatina, la dopamina y/o sus análogos o agonistas. Para que se puedan seguir utilizando estos compuestos para los tratamientos antitumorales a pesar de este efecto de hipermetilación y/o desacetilación, se necesitarían unas dosis muy altas de estos compuestos para observar la más mínima actividad. Sin embargo, tal y como se describe en la presente memoria, tanto para los análogos de la somatostatina y/o agonistas de la dopamina como para los desmetilantes y/o inhibidores de las HDAC, se pueden utilizar dosis más bajas debido al fuerte efecto sinérgico. Esto es ventajoso, ya que disminuye al mínimo los efectos secundarios de estos compuestos, que podrían tener un efecto negativo sobre el tejido normal. El efecto sinérgico aumenta incluso por el hecho de que parece que los desmetilantes incrementan la expresión de los receptores de la somatostatina y/o dopamina en la superficie de las células tumorales.

Tal y como se explicó en la parte introductoria, en la técnica se conoce un número aceptable de análogos de la somatostatina. Estos comprenden derivados de la propia somatostatina (tales como la somatostatina 14 y la somatostatina 28) o de la cortistatina (cortistatina 14, cortistatina 17, cortistatina 29). Los análogos de la somatostatina farmacéuticamente preferibles son octreotida, vapreotida, lanreotida, CH275, CH288, BIM 23926, BIM23206, BIM 23056, BIM 23268, BIM 23052, BIM 23244 y D Tyr(8)CYN 154806, y los agonistas no peptídicos desarrollados recientemente L 779.976, L 803.087 y L 817.818 (Olias, G. et al., 2004, *J Neurochem* 89: 1057-1091). Como agonistas de la dopamina se puede utilizar cualquiera de los bien conocidos amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol, pramiprexol y rasagilina. Muy recientemente, se han sintetizado moléculas quiméricas o híbridas de somatostatina-dopamina, tales como BIM 23A387 (Saveanu, A. et al., 2002, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 87: 5545-5552), BIM 23A758, BIM 23A760, BIM 23A761 y BIM 23A765 (Jaquet, P. et al., 2005, *Eur. J. Endocrinol.* 153: 135-141), todas las cuales muestran una alta afinidad por el receptor de la somatostatina y el de la dopamina, así como los ligandos «universales» de la somatostatina SOM-230 (Bruns, C. et al., 2002, *Eur. J. Endocrinol.* 146: 707-716) y KE-108 (Reubi, J. C., et al., 2002, *Eur. J. Pharmacol.* 456: 45-49), que se fijan con una alta afinidad a la mayoría de los subtipos de receptores de la somatostatina. SOM-230 y KE-108 tienen características de semivida idóneas.

Los compuestos mencionados más arriba se suelen administrar en el modo en el que se administran en la monoterapia. Esto significa que se pueden administrar como una dosis única o como dosis repetidas en forma sólida o líquida (como comprimido, pastilla para chupar, gránulos, polvo, bolsita, cápsula, supositorio, emulsión, solución, linimento, tintura, gel, etc.) o mediante una formulación de liberación lenta (en o sobre vehículos tales como lípidos, liposomas o implantes, en forma de profármaco o en derivados de metabolización lenta, etc.).

Para los agonistas de la dopamina, esto significa que se pueden administrar preferiblemente en forma de comprimido por vía oral, aunque para facilitar la administración politerápica con otros compuestos tal y como se describe en los procedimientos y la composición en la presente memoria, se pueden utilizar otras formas farmacéuticas (geles, líquidos, pulverizadores, soluciones para inyección, etc.) y otras vías de administración (subcutánea, intramuscular, intraglótea, intravenosa, vía administración local [por ejemplo mediante implantes], transdérmica, etc.). Los análogos proteicos de la somatostatina se pueden administrar mediante inyección. La octreotida se puede dar como una inyección subcutánea o inyección intraglótea profunda (Octreotida-LAR), mientras que la lanreotida se puede administrar preferiblemente como una inyección intramuscular o subcutánea (lanreotida-autogel).

La vía de administración de las HDAC depende de la clase de compuesto que se utiliza y puede ser, por ejemplo, oral o por inyección. Se puede llevar a cabo una estrategia parecida para los desmetilantes descritos más arriba.

Las dosis que hay que aplicar se pueden deducir de las dosis y posologías que se utilizan con la administración normal de los fármacos anteriores, aunque, debido al efecto sinérgico de las combinaciones de la invención, se contempla comenzar con cantidades más bajas del fármaco o de los fármacos. Así pues, para cada una de las sustancias dadas a conocer más arriba, las posologías adecuadas pueden deducirse de la técnica anterior y adaptarse de acuerdo con los nuevos efectos sinérgicos de la forma adecuada.

Una dosis típica para la bromocriptina, agonista de la dopamina, es de 2,5 a 40 mg al día por administración oral (comprimido). De igual forma, para la cabergolina resultan adecuadas las dosis orales de 0,5 a 4,5 mg por semana dadas en una o dos dosis. La octreotida se administra preferiblemente mediante inyección; se puede administrar en dosis de 0,05 a 0,5 mg por inyección subcutánea cada 8 a 12 horas o, en el caso de la octreotida-LAR, en dosis de 10 a 40 mg mediante inyección intraglótea profunda una vez cada 4 semanas. La lanreotida de liberación lenta se puede administrar mediante una inyección intramuscular de 30 mg cada 1 a 2 semanas o, en el caso de la lanreotida-autogel, de 60 a 120 mg a través de una inyección subcutánea profunda cada 3 o 4 semanas. Se trata tan sólo de ejemplos no limitantes de las diferentes dosis y vías de administración que se pueden aplicar para unos pocos compuestos de los descritos en la presente memoria. El experto en la técnica tendrá los conocimientos y la pericia necesarios para seleccionar las dosis y las vías de administración adecuadas para estos y otros compuestos mencionados más arriba.

El desmetilante y/o inhibidor de las HDAC se puede administrar simultáneamente con el análogo de la somatostatina y/o el agonista de la dopamina, o se pueden administrar por separado. La terminología «composición farmacéutica» tal y como se utiliza en la presente memoria puede tener el significado convencional de una composición de dos o más de los fármacos tal y como se explica más arriba; sin embargo, también significa que comprende dosis para los tratamientos en los que los fármacos se administran por separado, p. ej., a diferentes intervalos de tiempo, pero donde la politerapia con los fármacos proporciona el efecto terapéutico. Por tanto, ya que en especial los análogos de la somatostatina se dan preferiblemente como inyecciones de efecto prolongado (que serán eficaces durante varios días o semanas), se puede contemplar una posología oral del o de los desmetilantes y/o inhibidor o inhibidores de las HDAC. Sin embargo, estos también pueden administrarse como formulaciones de liberación lenta para disminuir al mínimo el malestar para y/o el incumplimiento por parte del paciente. Preferiblemente, el desmetilante y/o el inhibidor de las HDAC se dan antes de administrar el análogo de la somatostatina y/o agonista de la dopamina. De este modo se consigue que la maquinaria celular (receptor(es), cascada de señalización, etc.) que señala y ejerce los efectos de la somatostatina y/o de la dopamina esté lista y en forma funcional. Los investigadores han encontrado que el tratamiento previo con AZA (decitabina) durante un día ya potencia la sinergia de la actividad, sobre la fragmentación del ADN (apoptosis) o la proliferación celular, con un análogo de la somatostatina o un agonista de la dopamina o una molécula quimérica de somatostatina-dopamina.

Una composición de acuerdo con la invención comprende básicamente dos componentes (un componente seleccionado del grupo de desmetilantes que consisten en 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC, decitabina), 5-azacitidina (5-azaC), arabinosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC), en donde el segundo componente se selecciona del grupo de agonistas de la dopamina que consiste en amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol, pramiprexol, rasagilina, BIM23A387, BIM-23A758, BIM-23A760, BIM-232A761 y BIM-23A765). En una realización preferida, la composición comprende tres o cuatro componentes. En el sistema de tres componentes, la composición comprende al menos un desmetilante, y al menos un agonista de la dopamina como más arriba, y al menos un inhibidor de las HDAC seleccionado del grupo que consiste en ácidos hidroxamínicos, ácidos carboxílicos, benzamidas, epóxidos, FK228, apicidina A, B y C. En el sistema de cuatro componentes, la composición comprende al menos un desmetilante, al menos un agonista de la dopamina y al menos un inhibidor de las HDAC como anteriormente, y al menos un análogo de la somatostatina seleccionado del grupo que consiste en somatostatina 14, somatostatina 28, cortistatina 14, cortistatina 17, cortistatina 29, octreotida, vapreotida, lanreotida, CH275, CH-288, BIM-23056, BIM-23206, BIM-23268, BIM-23926, BIM-23052, BIM-23244,

BIM-23A758, BIM-23A760, BIM-232A761, BIM-23A765, L- y D-Tyr(8)CYN154806, L-779.976, L-803.087, L-817.818, BIM23A387, SOM-320 y KE-108. En el sistema de dos o cuatro componentes, un componente seleccionado del grupo de análogos de la somatostatina y de agonistas de la dopamina es ventajosamente un ligando quimérico de somatostatina-dopamina, tal como 6-propil-8β-ergolinilmetiltioacetil-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, 6-propil-8β-ergolinilmetiltioacetil-Lys(6-propil-8β-ergolinilmetiltioacetil)-D-Tyr-D-Tyr-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, D-6-propil-8β-ergolinilmetil-tioacetil-D-Lys(D-6-propil-8β-ergolinil-metiltioacetil)-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, 6-propil-8β-ergolinilmetiltioacetil-D-Phe-c(Cys-3-1-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH₂ o 6-propil-8β-ergolinilmetiltioacetil-Lys(6-propil-8β-ergolinilmetiltioacetil)-D-Tyr-D-Tyr-c(Cys-3-1-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-NH₂ o un análogo universal de la somatostatina, tal como SOM-230 o KE-108.

En un aspecto, la invención también da a conocer una composición farmacéutica que comprende 5-aza-2'-desoxicitidina y octreotida, y una composición farmacéutica que comprende 5-aza-2'-desoxicitidina y BIM-23926 o BIM-23206.

Además de una composición, también se describe en la presente memoria un procedimiento de tratamiento. Tal y como se indicó, tal procedimiento de tratamiento puede comprender la administración simultánea o secuencial de al menos un desmetilante o al menos un inhibidor de las HDAC y al menos un análogo de la somatostatina o al menos un agonista de la dopamina o al menos un ligando quimérico de somatostatina-dopamina o al menos un análogo universal de la somatostatina. Si es secuencial, a saber, si se aplica la administración no simultánea, se prefiere administrar el desmetilante y/o el inhibidor de las HDAC antes de la administración de los otros compuestos. Preferiblemente, el tratamiento con el desmetilante y/o inhibidor de las HDAC se comienza varios días (al menos un día) hasta un máximo de dos semanas antes de la administración del análogo de la somatostatina o del agonista de la dopamina.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de los tumores en los pacientes que tienen un tumor que expresa los receptores de la somatostatina y/o de la dopamina en su superficie. Se ha encontrado que muchos tumores comprenden al menos uno de los dos receptores, y por lo general, ambos receptores se expresan juntos. Los tumores que serían adecuados para el tratamiento con las composiciones de la invención comprenden tumores neuroendocrinos, tales como adenoma hipofisario, tumor de células de los islotes, insulinoma, carcinoide, feocromocitoma, paraganglioma, cáncer tiroideo medular; adenocarcinomas, tales como el tumor de mama, riñón, colon, páncreas, próstata u ovario; tumores del cerebro, tal como meningioma; neoplasias hemáticas, tales como linfoma de Hodgkin y de no hodgkiniano y leucemia crónica y aguda; otras neoplasias como el cáncer hepatocelular.

Además de la ventaja de combatir la proliferación tumoral, las composiciones de la invención también prevendrán el exceso de secreción hormonal desde los tumores, por lo que disminuyen los efectos pleiotrópicos inducidos por el exceso de hormonas que experimentan los pacientes con estos tumores.

Ejemplo

Métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células BON carcinoides pancreáticas humanas se obtuvieron de la University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, EE.UU. Se cultivaron las células en un incubador humidificado que contenía CO₂ al 5% a 37 °C. El medio de cultivo consistía de una mezcla 1:1 del medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y el medio F12K, complementando con FCS al 10%, penicilina (1 x 10⁵ U/l), fungizona (0,5 mg/l) y L-glutamina (2 mmol/l). Se confirmó periódicamente que las células no contenían *Mycoplasma*. Se recogieron las células con tripsina en EDTA al 10%.

Ejemplo

Métodos

Líneas celulares y condiciones del cultivo

Las células BON carcinoides pancreáticas humanas se obtuvieron de la University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, EE.UU. Se cultivaron las células en un incubador humidificado que contenía CO₂ al 5% a 37 °C. El medio de cultivo consistía de una mezcla 1:1 del medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y el medio F12K, complementando con FCS al 10%, penicilina (1 x 10⁵ U/l), fungizona (0,5 mg/l) y L-glutamina (2 mmol/l). Se confirmó periódicamente que las células no contenían *Mycoplasma*. Las células se recogieron con tripsina en EDTA al 10% y se resuspendieron en el medio. Antes de la siembra en placas, se contaron las células al microscopio con un hemocitómetro estándar. Se utilizó tinción de azul tripano para evaluar la viabilidad celular, que siempre superaba el 95%. Los medios y suplementos se obtuvieron de GIBCO Bio-cult Europe (Invitrogen, Breda, Países Bajos).

Ensayo de proliferación celular

Después de la tripsinización, las células se sembraron en 1 ml de medio en placas de 24 pocillos a una densidad de 0,4 a 2×10^4 células/pocillo. A continuación, las placas se colocaron en un incubador de CO₂ al 5%, a 37 °C. Tres días después, el medio de cultivo celular fue reemplazado por 1 ml de medio por pocillo que contiene 5-aza-2'-desoxicitidina a diferentes concentraciones en el experimento de la curva de respuesta a la dosis (0, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M) o 5-aza-2'-desoxicitidina (5×10^{-8} M) con o sin octreotida, el análogo de la somatostatina, (10^{-8} M) o cabergolina, el agonista de la dopamina, (10^{-8} M). En experimentos que evalúan la politerapia de 5-aza-2'-desoxicitidina y octreotida o cabergolina, se ha realizado un tratamiento previo con 5-aza-2'-desoxicitidina (5×10^{-8} M) durante 24 horas.

- 5
10 Las placas se incubaron de nuevo a 37 °C y con CO₂ al 5%. Después de 3 y 6 días de tratamiento, las células se recogieron para medir el ADN. Placas para 6

Ensayos de apoptosis (fragmentación del ADN)

Tras la tripsinización, las células BON se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1,5 a 2×10^4 células/pocillo. Estas placas se colocaron en un incubador de CO₂ al 5%, a 37 °C. Tres días después, el medio de cultivo celular se renovó en presencia y ausencia (grupo de control) de 5-aza-2'-desoxicitidina a diferentes concentraciones en el experimento de la curva de respuesta a la dosis (10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M) o 5-aza-2'-desoxicitidina (5×10^{-8} M) con o sin el análogo de la somatostatina, octreotida, (10^{-8} M) o el agonista de la dopamina, cabergolina, (10^{-8} M). En los experimentos que evalúan la politerapia de 5-aza-2'-desoxicitidina y octreotida, cabergolina o los nuevos análogos de la somatostatina BIM 23206, BIM 23926 y la quimera de somatostatina-dopamina BIM 23A765, se ha realizado un tratamiento previo con 5-aza-2'-desoxicitidina (5×10^{-8} M) durante 24 horas.

- 15
20
25
30
35
40 Se realizaron cuadruplicados de cada tratamiento. Después de una incubación adicional de 3 días, se valoró la apoptosis con un kit comercial de ELISA (Cell Death Detection ELISAPlus, Roche Diagnostic GmbH, Penzberg, Alemania). Este ensayo se basa en un principio de inmunoensayo enzimático cuantitativo de tipo sándwich con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra el ADN y las histonas, respectivamente. Esto permite determinar específicamente los mono- y oligonucleosomas en la fracción citoplasmática del lisado celular, típico de la apoptosis. Se utilizó el protocolo estándar proporcionado por el fabricante. Brevemente, el medio se retiró cuidadosamente por aspiración, las células se incubaron en 100 µl de tampón de lisis (proporcionado con el ensayo Cell Death Detection ELISAPlus). Después de la lisis de las células, durante 2 horas se incubó la solución con anticuerpos anti-ADN y anti-histona en una placa de 96 pocillos revestida con estreptavidina. Tras el lavado, la peroxidasa fijada al inmunocomplejo se detectó con 2,2'-azino-di[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina] (un sustrato cromógeno) para la detección espectrofotométrica a 405 nm, para cuantificar la cantidad del principio del inmunoensayo enzimático con anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra el ADN y las histonas, respectivamente. Esto permite determinar específicamente los mono- y oligonucleosomas en la fracción citoplasmática del lisado celular, típico de la apoptosis. Se utilizó el protocolo estándar proporcionado por el fabricante. Brevemente, el medio se retiró cuidadosamente por aspiración, las células se incubaron en 100 µl de tampón de lisis (proporcionado con el ensayo Cell Death Detection ELISAPlus). Después de la lisis de las células, durante 2 horas se incubó la solución con anticuerpos anti-ADN y anti-histona en una placa de 96 pocillos revestida con estreptavidina. Después del lavado, la peroxidasa fijada al inmunocomplejo se detectó con 2,2'-azino-di[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina] (un sustrato cromógeno) para la detección espectrofotométrica a 405 nm, para cuantificar la cantidad de nucleosomas fijados a la placa. Se determinó la apoptosis relativa mediante una proporción de la absorbancia media de los pocillos del tratamiento por la absorbancia media de los pocillos de control.

Resultados

Efecto de la octreotida y de la cabergolina sobre la proliferación celular.

- 45 Durante una incubación de 3 o 6 días con la octreotida (10^{-8} M) o la cabergolina (10^{-8} M), no se observó ningún efecto estadísticamente significativo de ambos fármacos sobre el crecimiento celular carcinoide de las BON, medido como el contenido de ADN que refleja el número de células. Las figuras 1A y 2A, que representan cada una la media \pm EEM de dos experimentos independientes, muestran los efectos de la octreotida o de la cabergolina después de 6 días de incubación.
- 50 Efecto de la 5-aza-2'-desoxicitidina sobre la proliferación celular.

Durante una incubación de 3 o 6 días con 5-aza-2'-desoxicitidina, se inhibió significativamente el crecimiento de las células carcinoideas BON, de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (no se muestran los datos). Tras 6 días de incubación, el valor de la CI25 del efecto inhibitor del crecimiento de las células tumorales de 5-aza-2'-desoxicitidina era

- 55 Efecto de la octreotida y de la cabergolina sobre la apoptosis (fragmentación del ADN).

- 5 Durante una incubación de 3 días con la octreotida (10^{-8} M) o con la cabergolina (10^{-8} M), no hubo ningún efecto estadísticamente significativo de ninguno de los fármacos sobre la apoptosis, medida como fragmentación del ADN, en las células carcinoides BON. Las figuras 1B y 2B, que representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes, muestran los efectos de la octreotida y de la cabergolina sobre la inducción de la fragmentación del ADN. Se obtuvo un resultado similar para el tratamiento con los análogos de la somatostatina BIM 23926 y BIM 23206 y la quimera de somatostatina-dopamina BIM 23A765 sola.
- Efecto de la 5-aza-2'-desoxicitidina sobre la apoptosis (fragmentación del ADN).
- 10 Una incubación de 3 días con 5-aza-2'-desoxicitidina indujo significativamente la fragmentación del ADN en las células carcinoides BON, de una manera dependiente de la dosis y del tiempo (no se muestran los datos). Después de 3 días de incubación, el valor EC25 del efecto inductor de la apoptosis de la 5-aza-2'-desoxicitidina fue de aproximadamente 5×10^{-8} M. Las figuras 1B y 2B muestran que una dosis baja de la 5-aza-2'-desoxicitidina (5×10^{-8} M) indujo significativamente la fragmentación del ADN aproximadamente al 100% en las células carcinoides BON ($p < 0,001$ frente al control).
- 15 Efecto que la politerapia con la 5-aza-2'-desoxicitidina y la octreotida o la cabergolina tiene sobre la apoptosis (fragmentación del ADN).
- Las figuras 1B y 2B muestran que la politerapia con 5-aza-2'-desoxicitidina y octreotida (10^{-8} M) o cabergolina (10^{-8} M) indujo una inducción estadísticamente más alta de la fragmentación del ADN en las células carcinoides BON después de 3 días, en comparación con el efecto de la 5-aza-2'-desoxicitidina sola ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente).
- 20 Efecto que la politerapia con 5-aza-2'-desoxicitidina y los nuevos análogos de la somatostatina BIM 23926 y BIM 23206 tiene sobre la apoptosis.
- La figura 3 muestra que los análogos de la somatostatina cuando se administran solos no tienen ningún efecto sobre la apoptosis (fragmentación del ADN) de las células carcinoides BON humanas. No obstante, se observó un incremento considerable a partir del efecto moderado de la AZA sola, cuando se administró la AZA junto a cualquiera de los nuevos análogos.
- 25 Efecto que la politerapia con 5-aza-2'-desoxicitidina y la quimera de somatostatina-dopamina BIM 23A765 tiene sobre la apoptosis.
- La figura 4 muestra que cuando la quimera de somatostatina-dopamina se administra sola, no tiene ningún efecto sobre la apoptosis (fragmentación del ADN) de las células carcinoides BON humanas. No obstante, se observó un incremento considerable desde el efecto moderado de la monoterapia con AZA cuando se administró la AZA junto con BIM 23A765.
- 30

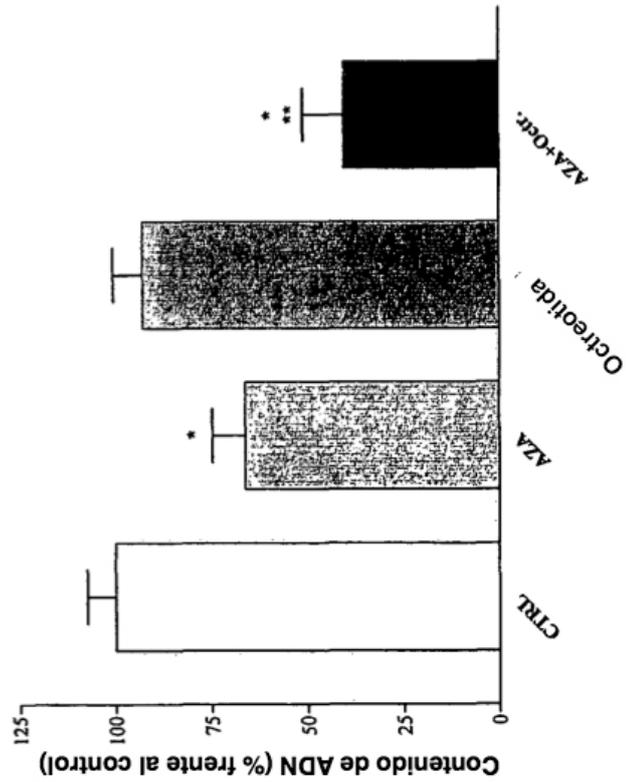
REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende al menos un desmetilante y al menos un agonista de la dopamina;
 en donde el al menos un desmetilante se selecciona del grupo que consiste en 5-aza-2'-desoxicidina (DAC, decitabina), 5-azacitidina (5-azaC), arabinosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC); y el al menos un agonista de la dopamina se selecciona del grupo que consiste en amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol, pramiprexol, rasagilina, BIM23A387, BIM-23A758, BIM-23A760, BIM-232A761 y BIM-23A765.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende adicionalmente al menos un inhibidor de las HDAC seleccionado del grupo que consiste en ácidos hidroxamínicos, ácidos carboxílicos, benzamidas, epóxidos, FK228, apicidina A, B y C.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende al menos un desmetilante, al menos un inhibidor de las HDAC, al menos un análogo de la somatostatina seleccionado del grupo que consiste en somatostatina 14, somatostatina 28, cortistatina 14, cortistatina 17, cortistatina 29, octreotida, vapreotida, lanreotida, CH275, CH-288, BIM-23056, BIM-23206, BIM-23268, BIM-23926, BIM-23052, BIM-23244, BIM-23A758, BIM-23A760, BIM-232A761, BIM-23A765, L- y D-Tyr(8)CYN154806, L-779.976, L-803.087, L-817.818, BIM23A387, SOM-320 y KE-108, y al menos un agonista de la dopamina.
4. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho ácido hidroxamínico se selecciona del grupo que consiste en tricostatina A, SAHA, NVP-LAQ-82425 y PXD-101; o
 en donde dicho ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en ácido butanoico, ácido valproico y ácido 4-fenoxibutanoico; o
 en donde dicha benzamida se selecciona del grupo que consiste en N-acetildinalina y MS-275; o
 en donde dicho epóxido se selecciona del grupo que consiste en depeudicina y trapoxina A.
5. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde al menos un análogo de la somatostatina se selecciona del grupo que consiste en somatostatina 14, somatostatina 28, cortistatina 14, cortistatina 17, cortistatina 29, octreotida, vapreotida y lanreotida.
6. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en donde al menos un análogo de la somatostatina se selecciona del grupo que consiste en SOM-230 y KE-108.
7. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el al menos un agonista de la dopamina se selecciona del grupo que consiste en amantadina, bromocriptina, cabergolina, quinagolida, lisurida, pergolida, ropinirol, pramiprexol y rasagilina.
8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el desmetilante es la 5-aza-2'-desoxicidina y el agonista de la dopamina es la cabergolina.
9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el desmetilante es la 5-aza-2'-desoxicidina y el al menos un agonista de la dopamina es la quimera de somatostatina-dopamina BIM-23A765.
10. Composición farmacéutica que comprende la 5-aza-2'-desoxicidina y la octreotida.
11. Composición farmacéutica que comprende la 5-aza-2'-desoxicidina y BIM-23926 o BIM-23206.
12. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el uso en el tratamiento de un tumor que expresa los receptores de la dopamina en su superficie.
13. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho tumor es un tumor neuroendocrino, un adenocarcinoma, un tumor cerebral, una neoplasia hemática y un cáncer hepatocelular.
14. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho tumor neuroendocrino se selecciona del grupo que consiste en adenoma hipofisario, tumor de células de islotes, insulinoma, carcinoide, feocromocitoma, paraganglioma, cáncer tiroideo medular; o
 en donde dicho adenocarcinoma se selecciona del grupo que consiste en tumor de mama, riñón, colon, páncreas, próstata u ovario; o
 en donde dicho tumor cerebral es un meningioma; o
 en donde dicha neoplasia hemática se selecciona del grupo que consiste en linfoma de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano, y leucemia crónica y aguda.
15. Composición farmacéutica tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para el uso en el tratamiento de un tumor.

Figura 1

A

Efecto sobre la proliferación celular tras 7 días de incubación con AZA (5×10^{-8} M) y 6 días de incubación con octreotida (10^{-8} M) en las células BON (*: $p < 0,001$ frente a control: **: $p < 0,05$ frente a AZA)



B

Fragmentación del ADN corregida por la cuantificación del ADN tras 4 días de incubación con AZA (5×10^{-8} M) y 3 días de incubación con octreotida (10^{-8} M) en las células BON (*: $p < 0,001$ frente a control: **: $p < 0,05$ frente a AZA)

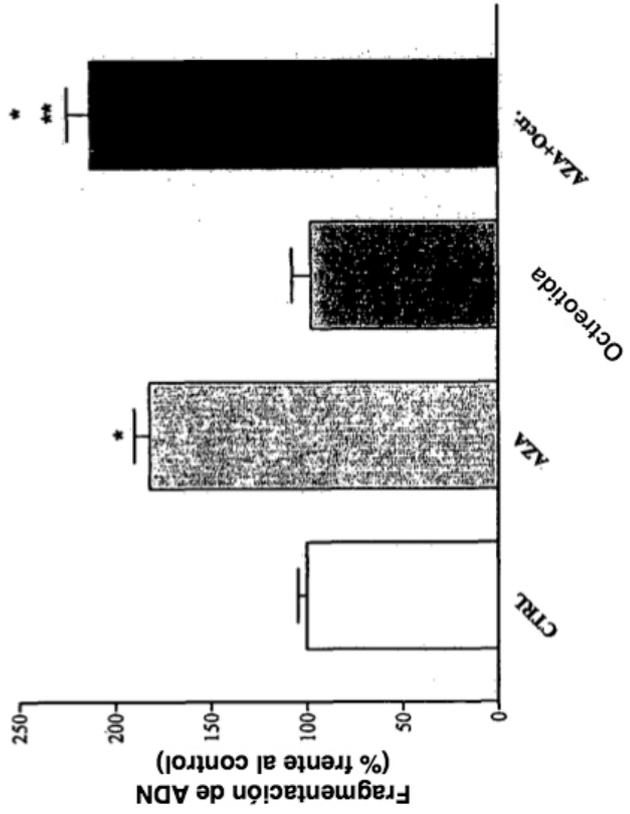
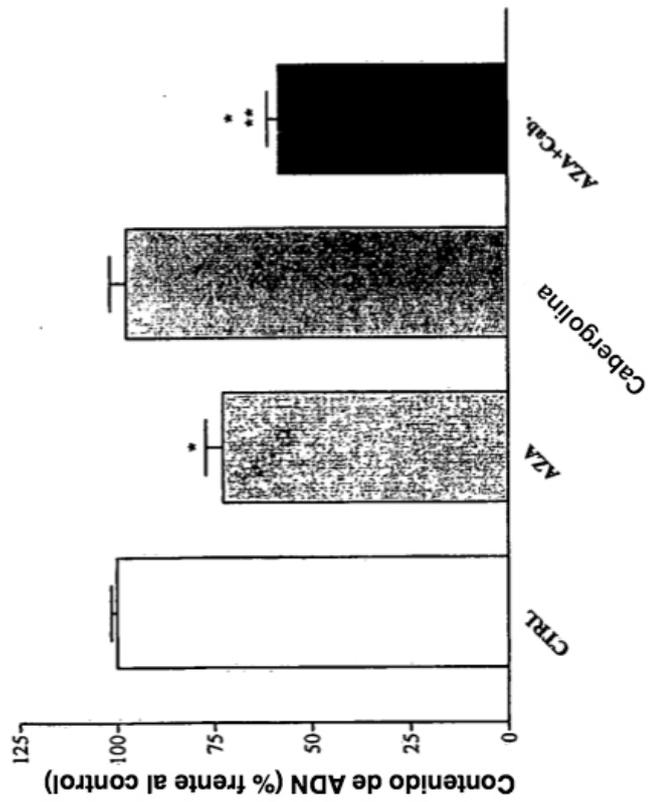


Figura 2

A

Efecto sobre la proliferación celular tras 7 días de incubación con AZA (5×10^{-8} M) y 6 días de incubación con cabergolina (10^{-8} M) en las células BON (*: $p < 0,001$ frente a control: **: $p < 0,01$ frente a AZA)



B

Fragmentación del ADN corregida por la cuantificación del ADN tras 4 días de incubación con AZA (5×10^{-8} M) y 3 días de incubación con cabergolina (10^{-8} M) en las células BON (*: $p < 0,001$ frente a control: **: $p < 0,001$ frente a AZA)

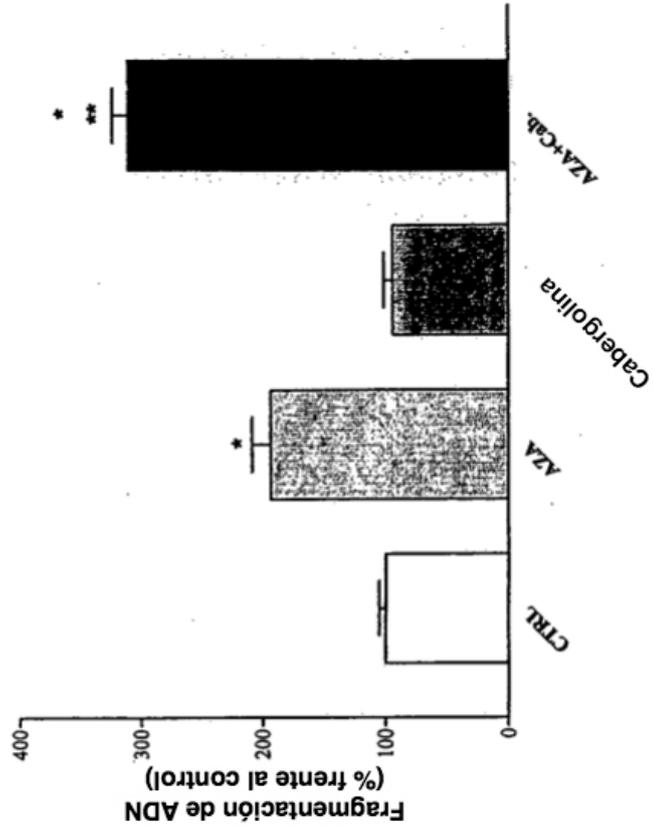


Figura 3

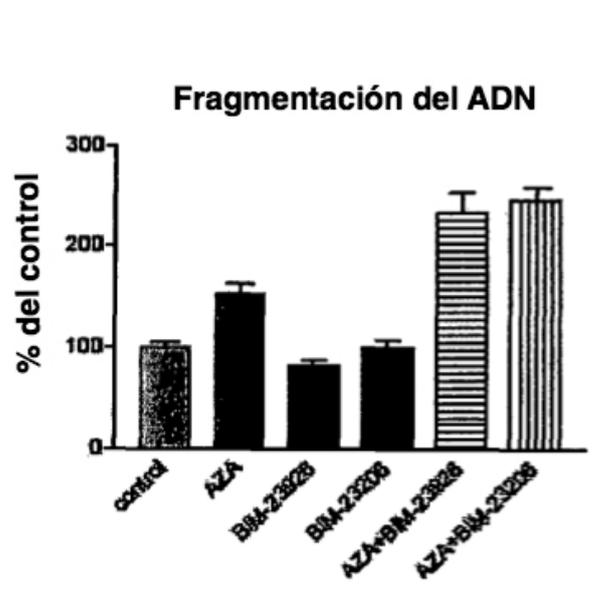


Figura 4

