

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 628**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11719829 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2572198**

54 Título: **Terapia de combinación y método de evaluación de la resistencia a un tratamiento**

30 Prioridad:

**19.05.2010 US 346247 P**

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

**28.08.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse, 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOYLAN, JOHN FREDERICK y  
HE, WEI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 488 628 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

Terapia de combinación y método de evaluación de la resistencia a un tratamiento

5 La presente invención se refiere a un método y a un kit para la determinación de la resistencia de un sujeto a un tratamiento con 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida. La invención también se refiere a una terapia de combinación para el tratamiento de un paciente que padece un trastorno proliferativo, que comprende la administración de 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida y al menos uno de entre un agente anti-IL-6 y un agente anti-IL-8.

Antecedentes de la invención

15 La proteína Notch es una proteína transmembrana presente en la mayoría de los organismos, incluyendo los mamíferos, que tiene un papel en la regulación de la expresión génica. Tras la unión de un ligando al dominio extracelular de Notch, la proteína Notch es escindida justo fuera de la membrana por la enzima convertora del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TACE), liberando el dominio extracelular que permanece en interacción con el ligando. A continuación, la secretasa  $\gamma$  escinde la proteína justo dentro de la membrana, liberando el dominio intracelular (conocido como Notch intracelular activa o "ICN"). La ICN se transloca al núcleo de la célula y activa el factor de transcripción CSL, induciendo de este modo la transcripción génica.

20 La señalización de Notch defectuosa se ha implicado en diversos trastornos, incluyendo trastornos proliferativos. Como tal, la inhibición de la señalización de Notch es un campo de gran interés en oncología. La inhibición de la secretasa  $\gamma$  bloquea la vía de señalización de Notch y, como tales, los inhibidores de la secretasa  $\gamma$  tienen actividad antiproliferativa.

30 La 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida (también denominada en el presente documento "Compuesto I") es un inhibidor potente y selectivo de la secretasa  $\gamma$  que inhibe la señalización de Notch en las células tumorales. Se sabe que los xenoinjertos tratados con el Compuesto I muestran una reducción en la expresión de los genes asociados con la angiogénesis que coincide con la capacidad del Compuesto I para inhibir la angiogénesis tumoral. Luistro *et al.*, *Cancer Research*, 69:7672-80 (2009). Curiosamente, estos estudios mostraron poco cambio en el perfil de genes angiogénicos para el xenoinjerto H460a.

35 La interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-8 (IL-8) son potentes citocinas que desempeñan un papel importante en diversos trastornos tales como la infección y la inmunidad, la inflamación, las enfermedades autoinmunes y el cáncer. Los solicitantes han encontrado que la expresión elevada tanto de IL-6 como de IL-8 confiere resistencia al tratamiento con el Compuesto I.

40 Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a un método para la determinación de la resistencia de un sujeto a un tratamiento contra una enfermedad proliferativa con 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida, que comprende la medición del nivel de un biomarcador presente en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, siendo dicho biomarcador IL-6 o IL-8.

La presente invención se refiere además a un método de tratamiento de un paciente que padece un trastorno proliferativo, que comprende la administración al paciente de: (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 o anti-IL-8.

50 La presente invención se refiere además a una combinación secuencial o simultánea de (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 para su uso como un medicamento, en particular como medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo tal como el cáncer, especialmente tumores sólidos, más particularmente tumores de mama, colorrectal, de pulmón y de próstata.

55 Un aspecto adicional de la presente invención es un kit que comprende: (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 o anti-IL-8.

60 En otro aspecto adicional más, la presente invención se refiere al uso de una combinación de (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en particular, de cáncer, más particularmente, de tumores sólidos tales como tumores de mama, colorrectal, de pulmón y de próstata.

El agente anti-IL-6 o anti-IL-8 es un ARN antisentido, ARNhc, ARNip o anticuerpo de IL-6 o IL-8.

65

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa los resultados de un ensayo de matriz de citocinas realizado en líneas celulares NCI-H460a y A549.

La Figura 2 representa la cantidad de IL-6 e IL-8 secretada medida procedente de diversas líneas celulares usando ELISA.

La Figura 3 representa la cantidad de ARNm que codifica IL-6 e IL-8 medida de diversas líneas celulares usando qRT-PCR.

La Figura 4 representa la cantidad de IL-6 e IL-8 secretada medida de células H460a, células A549 parentales, células A549 de control, células A549 que sobreexpresan IL-6 y células A549 que sobreexpresan IL-8 usando ELISA.

La Figura 5 representa el efecto del tratamiento con el Compuesto I y el efecto del tratamiento con Taxol® sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto que reciben: células H460a, células A549 parentales, células A549 de control, células A549 que sobreexpresan IL-6, células A549 que sobreexpresan IL-8 y una mezcla 1:1 de células A549 que sobreexpresan IL-6 y células A549 que sobreexpresan IL-8.

La Figura 6 representa la cantidad de ARNm que codifica IL-8 y la cantidad de IL-8 secretada medida de células H460a parentales, células H460a que reciben un vector de control y células H460a con la expresión de IL-8 anulada.

La Figura 7 representa el efecto sobre el crecimiento tumoral del tratamiento con Compuesto I medido en modelos de xenoinjerto de H460a y H460a con la expresión de IL-8 anulada.

La Figura 8 representa el efecto sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de H460a del tratamiento con el Compuesto I, el tratamiento con anticuerpo anti-IL-8 y la terapia de combinación con el Compuesto I y el anticuerpo anti-IL-8.

La Figura 9 representa el efecto sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de H460a del tratamiento con el Compuesto I, el tratamiento con anticuerpo anti-IL-6 y la terapia de combinación con el Compuesto I y el anticuerpo anti-IL-6.

La Figura 10 representa los niveles de ARNm que codifica IL-6 e IL-8 en diversas líneas celulares medidos usando qRT-PCR.

La Figura 11 representa los niveles de IL-6 e IL-8 secretados por diversas líneas celulares medidos usando ELISA.

La Figura 12 representa la regulación negativa de ARNm de *Hes1* en células U87MG y LOX tras el tratamiento con el Compuesto I.

La Figura 13 representa el efecto del tratamiento con Compuesto I sobre el crecimiento tumoral en células U87MG y LOX.

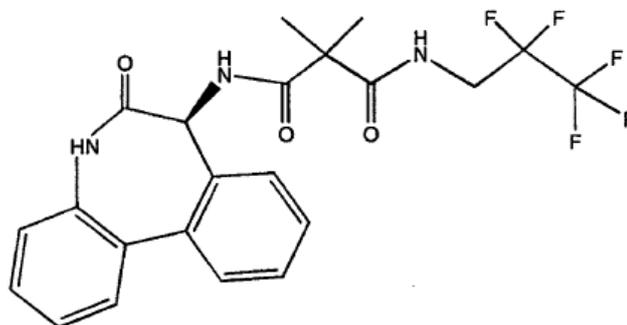
La Figura 14 representa la cantidad de IL-6 e IL-8 secretada medida usando ELISA en células H460a, células H460a tratadas con el Compuesto I, células H460a con la expresión de IL-8 anulada, células H460a con la expresión de IL-8 anulada tratadas con el Compuesto I, células U87MG y células U87MG tratadas con el Compuesto I.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y expresiones usados en la presente solicitud, incluyendo la memoria descriptiva y las reivindicaciones, tienen las definiciones que figuran a continuación. Cabe señalar que, como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "ella" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se usa en el presente documento, "Compuesto I" se refiere a 2,2-dimetil-N-((S)-6-oxo-6,7-dihidro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-il)-N'-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida que es útil como inhibidor de la secretasa  $\gamma$ . El Compuesto I tiene la siguiente estructura:



(1)

El Compuesto I se administra en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para el tratamiento de un trastorno proliferativo. Dicha cantidad puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 400 ng.h/ml a aproximadamente 9.000 ng.h/ml, de aproximadamente 1.100 ng.h/ml a aproximadamente 4.100 ng.h/ml, o de aproximadamente 1.380 ng.h/ml a aproximadamente 2.330 ng.h/ml. Preferentemente, el Compuesto I se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 400 ng.h/ml a aproximadamente 9.000 ng.h/ml administrada en un período de hasta aproximadamente 21 días, de aproximadamente 1.100 ng.h/ml a aproximadamente 4.100 ng.h/ml administrada en un período de hasta aproximadamente 21 días, o de aproximadamente 1.380 ng.h/ml a aproximadamente 2.330 ng.h/ml administrada en un período de hasta aproximadamente 21 días. Más preferentemente, el Compuesto I se administra una vez al día los días 1, 2, 3, 8, 9 y 10 de un ciclo de 21 días. El Compuesto I también se puede administrar una vez al día los días 1 a 7 de un ciclo de 21 días, o una vez al día todos los días.

El término "biomarcador" se refiere a una entidad objetivamente mensurable que sirve como indicador de un estado biológico.

La expresión "muestra biológica" se refiere a una porción (por ejemplo, sangre, suero, tejido, flema, orina, saliva) obtenida de un sujeto, en la que se puede medir un biomarcador.

El término "nivel", en referencia a un biomarcador, se refiere a una medida de la concentración, de la actividad, del nivel de expresión o de la cantidad de un biomarcador presente. El nivel se puede determinar cuantitativamente, por ejemplo, midiendo la concentración o la masa del biomarcador presente en una muestra o, por ejemplo, mediante la determinación de la cantidad de ARNm que codifica el biomarcador que se expresa en una determinada población celular o tejido. Como alternativa, el nivel se puede determinar más cualitativamente, por ejemplo, como aquel por encima o por debajo de un nivel umbral establecido. El nivel umbral puede corresponder a un nivel medio del biomarcador en sujetos sanos, o puede corresponder al nivel en el que se realice el diagnóstico de la enfermedad. Se dice que un biomarcador está presente a un "nivel elevado" si el nivel medido es superior a un nivel umbral establecido.

"Sujeto" incluye mamíferos y aves. "Mamíferos" significa cualquier miembro de la clase de los mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos; primates no humanos tales como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos; animales domésticos tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratas, ratones y cobayas; y similares. El término "sujeto" no indica una edad ni un sexo en particular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" indica que el vehículo indicado no tiene propiedades que puedan hacer que un médico razonablemente prudente evite la administración del mismo a un paciente, teniendo en cuenta la enfermedad o las afecciones que se vayan a tratar y la vía de administración correspondiente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto, o una combinación o una composición, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado tras su administración a un paciente, por ejemplo, para detener el crecimiento, o producir la reducción, de un tumor canceroso o para aumentar la duración de la vida del paciente.

Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo es cáncer.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento/una proliferación celular no regulado/a. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer colorrectal, melanoma y cáncer de tiroides.

"Inhibir el crecimiento o la proliferación celular" significa disminuir el crecimiento o la proliferación de una célula en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 %, e incluye la inducción de la muerte celular.

5 La expresión "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparación) de manera que cualquier experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores como de significación estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores.

10 El término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación neoplásicos de células, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y los tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer" y "canceroso", y las expresiones "trastorno de proliferación celular" y "trastorno proliferativo", así como el término "tumor" no son excluyentes entre sí cuando se hace referencia a ellos en el presente documento.

15 Se ha de entender que "tratamiento de un trastorno proliferativo" incluye el mantenimiento o la reducción del tamaño tumoral, la inducción de la regresión tumoral (bien parcial o total), la inhibición del crecimiento tumoral y/o el aumento de la duración de la vida de un paciente que sufre dicho trastorno.

#### 20 Método de determinación de la resistencia

La presente invención se refiere en parte a un método de determinación de la resistencia de un sujeto a un tratamiento contra un trastorno proliferativo con 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida (también denominado en el presente documento "Compuesto I"), que comprende medir el nivel de un biomarcador presente en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, siendo dicho biomarcador IL-6 o IL-8.

25 En una realización de la invención, el nivel de biomarcador presente en dicha muestra se compara con un nivel umbral para dicho biomarcador y, si es superior, se considera que dicho sujeto tiene resistencia *in vivo* al tratamiento con el Compuesto I. Para los fines del presente documento, incluyendo las reivindicaciones, "resistencia *in vivo*" se refiere a un efecto eficaz *in vivo* reducido del tratamiento con el Compuesto I.

30 En una realización de la invención, el biomarcador es IL-6 y dicho nivel umbral para IL-6 es de aproximadamente 500 pg/ml.

35 En una realización de la invención, el biomarcador es IL-8 y dicho nivel umbral para IL-8 es de aproximadamente 50 pg/ml.

40 El nivel de un biomarcador se puede determinar en base a la cantidad de la propia proteína o por su respectivo ARNm.

45 Las proteínas se pueden medir directamente mediante técnicas fisicoquímicas tales como electroforesis en gel, HPLC, espectroscopia de masas y técnicas de proteómica; técnicas de inmunoensayo tales como ELISA, ensayos competitivos, ensayos de sándwich y similares; y mediante ensayos de la actividad biológica (por ejemplo, como un ligando y/o una enzima), mediante la medición de dicha actividad en la muestra biológica a través de métodos conocidos en la técnica, a través de sistemas de ensayo de dos híbridos y similares. Hay ensayos comerciales disponibles para muchos o la mayoría de los biomarcadores anteriormente mencionados, o se describen en la técnica. Las muestras biológicas adecuadas incluyen sangre, suero, orina y similares.

50 Como alternativa, se puede determinar el nivel de ARNm que corresponde a los biomarcadores proteicos anteriormente mencionados. La determinación del nivel de transcripción del ARNm se puede realizar usando cualquier método cuantitativo o semicuantitativo adecuado, incluyendo, sin limitación, transferencia Northern; técnicas de micromatriz; RT-PCR, qRT-PCR y otros métodos de amplificación de ADN y ARNm cuantitativos y semicuantitativos; y similares. Por ejemplo, para realizar una RT-PCR, se puede extraer el ARN total de la muestra biológica, tratarlo con ADNasa1 y convertirlo en ADNc usando una transcriptasa inversa tal como la transcriptasa inversa Multiscribe (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). A continuación, se puede realizar un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real con "verde SYBR" para ADNc usando el ADNc como plantilla, y analizarlo usando un detector de secuencias ABI PRISM 7900.

60 En una realización de la presente invención, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

En una realización de la invención, el biomarcador medido es IL-6.

En una realización de la invención, el biomarcador medido es IL-8.

65 En una realización de la invención, se miden tanto la IL-6 como la IL-8.

En una realización de la invención, la muestra biológica es sangre.

En una realización de la invención, la muestra biológica es suero.

5 En una realización de la invención, la muestra biológica es orina.

En una realización de la invención, el biomarcador se mide mediante la medición de la cantidad de proteína presente en dicha muestra.

10 En una realización de la invención, el biomarcador se mide mediante la medición del nivel de ARNm que codifica el biomarcador.

#### Terapia de combinación

15 En una realización, la presente invención se refiere a una combinación secuencial o simultánea de (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 para su uso como un medicamento, en particular, para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo tal como el cáncer, en la que el agente anti-IL-6 o el agente anti-IL-8 es un ARN antisentido, ARNhc, ARNip o anticuerpo de IL-6 o IL-8.

20 En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicha combinación comprende tanto un agente anti-IL-6 como un agente anti-IL-8.

En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho agente anti-IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6.

25 En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho agente anti-IL-8 es un anticuerpo anti-IL-8.

30 En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho agente anti-IL-6 es un ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-6.

En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-6 es un ARN antisentido.

35 En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-6 es un ARNhc o un ARNip.

En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho agente anti-IL-8 es un ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-8.

40 En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-8 es un ARN antisentido.

45 En otra realización, la presente invención se refiere a la combinación y al uso anteriores, en los que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-8 es un ARNhc o un ARNip.

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit que comprende: (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8.

50 En otra realización, la presente invención se refiere al uso de una combinación de (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en particular, del cáncer.

#### **Ejemplos**

55 Las siguientes preparaciones y los siguientes ejemplos se dan para permitir a los expertos en la materia entender más claramente y poner en práctica la presente invención.

#### Ejemplo 1

60 El presente ejemplo muestra la respuesta de varios modelos de xenoinjerto diferentes al tratamiento con el Compuesto I.

65 Se usaron ratones *nu/nu* (desnudos) hembra obtenidos en Charles River Laboratories (Wilmington, MA) o ratones SCID hembra de color beis (Taconic, Germantown, NY) (10 ratones/grupo) con aproximadamente 8 a 14 semanas

de vida y un peso de aproximadamente 23 a 25 gramos. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de cuidado y uso de animales de Roche (RACUC).

5 Las líneas celulares de cáncer humano LOVO, BxPC3, HCT-116, A549, AsPC-1, MiaPaCa-2 y Calu-6 se adquirieron de la colección americana de cultivos tipo. La línea celular H460a fue un obsequio del doctor Jack Roth (MD Anderson Medical Center).

10 Para el implante de los xenoinjertos, se recogieron las células usando tripsina al 0,05 %, se lavaron y se centrifugaron en medio de cultivo, y se volvieron a suspender bien en una mezcla 1:1 de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Matrigel (BxPC-3) o solo en PBS (A549, H460a, LOVO, Calu-6, HCT-116, MiaPaca-2 y AsPC-1) a una concentración de  $1,5-5 \times 10^7$  células por ml. Se implantó un volumen de 0,2 ml de suspensión celular ( $7,5 \times 10^6$  células para A549,  $1 \times 10^7$  células para H460a,  $3 \times 10^6$  células para Calu-6 y HCT116,  $5 \times 10^6$  células para BxPC3 y AsPC-1,  $6 \times 10^6$  células para MiaPaca-2 y  $5 \times 10^6$  células para LOVO) por ratón subcutáneamente en el flanco derecho. Todos los modelos de xenoinjerto se implantaron en ratones desnudos a excepción de BxPC3, que se implantó en ratones SCID de color beis. Se dejó que crecieran los tumores durante 8 a 26 días después del implante hasta que el volumen medio alcanzó  $100-150 \text{ mm}^3$ , tras lo que los animales se asignaron al azar en grupos de tratamiento.

20 Se formuló el Compuesto I (sintetizado de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento WO2005/023772) en forma de una suspensión en Klucel al 1,0 % en agua con Tween®-80 al 0,2 % para la administración oral (po). El compuesto formulado y el vehículo se prepararon semanalmente y se almacenaron a 4 °C.

25 En el modelo de xenoinjerto de Calu-6, el Compuesto I se administró a 60 mg/kg al día cada dos semanas durante 4 semanas (7+/7- x 2 ciclos). El resto de modelos de xenoinjerto se administraron con el Compuesto I a 10 mg/kg al día.

30 Se tomaron mediciones de los tumores y de los pesos de los ratones dos veces a la semana. El análisis estadístico se determinó mediante la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, ANOVA de una vía y el ensayo t de Bonferroni post hoc (SigmaStat, versión 2.0, Jandel Scientific, San Francisco, CA). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad (p) fue  $< 0,05$ .

La inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) se midió 21 días después de iniciarse el tratamiento. Los resultados fueron como se muestra a continuación en la Tabla 1.

35

Tabla 1

Actividad <i>in vivo</i> en los modelos de xenoinjerto	
Tipo de tumor	% de ICT
LOVO (colon)	83
BxPC3 (páncreas)	82
HCT-116 (colon)	76
A549 (NSCLC)	70
AsPC-1 (páncreas)	58
MiaPaCa-2 (páncreas)	53
Calu-6 (NSCLC)	42
H460a (NSCLC)	8

Como se puede ver, el xenoinjerto de H460a presentó, con mucho, la menor cantidad de inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento con el Compuesto I (8 %).

40 Ejemplo 2

45 Tras identificar, en el Ejemplo 1, que el modelo de xenoinjerto de H460a presentó, con mucho, la menor cantidad de inhibición del crecimiento tumoral después del tratamiento con el Compuesto I, se llevó a cabo un ensayo de matrices de citocinas en las líneas celulares de NSCLC tanto H460a como A549 para determinar si había algún biomarcador que estableciera la línea celular H460a aparte.

Las matrices de citocinas se adquirieron en RayBiotech, Inc. (Norcross, GA.), y se usaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cultivaron las células durante 5 días, se recogieron los medios celulares y se eliminaron

las células desprendidas por centrifugación. Se incubaron cuatro mililitros de medios durante una noche con la matriz, seguido de varios lavados con PBS/Tween, seguidos del desarrollo de la señal.

Se determinó que la línea celular H460a expresó niveles más elevados tanto de IL-6 como de IL-8 que A549 o un control de suero. Véase la Figura 1.

5

#### Ejemplo 3

A continuación, se cuantificó la expresión de IL-6 e IL-8 en las líneas celulares BxPC3, HCT-116, A549, AsPC-1, MiaPaCa-2 y Calu-6 midiendo el nivel de proteína IL-6 e IL-8 secretada usando ELISA.

10

Los kits de ELISA para IL-6 se adquieren en Bender MedSystems (BMS213/2 o BMS213INST). Los kits de ELISA para IL-8 se adquieren en Bender MedSystems (BMS204/3INST) o R&D Systems (D8000C). Para medir la IL-6 y la IL-8 secretadas en medio de cultivo tisular, se sembraron las células a una densidad de medio millón en una placa de 35 mm. Al día siguiente, se lavaron las células con 2 ml de PBS, y después se rellenaron con 1 ml de medio recién preparado. Tras 24 horas, se recogió el medio y se usó de inmediato para el análisis de ELISA.

15

Como se ve a partir de los resultados (véase la Figura 2), las células H460a secretan cantidades más elevadas de proteínas IL-6 e IL-8 que las otras líneas celulares ensayadas, incluyendo 4 veces más de proteína IL-6 y 10 veces más de proteína IL-8 en comparación con las células A549.

20

#### Ejemplo 4

A continuación, se cuantificó la expresión de IL-6 e IL-8 en las líneas celulares BxPC3, HCT-116, A549, AsPC-1, MiaPaCa-2 y Calu-6 midiendo el nivel de ARNm usando qRT-PCR. Se realizaron el aislamiento del ARN y la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) usando técnicas convencionales de laboratorio. Los números de catálogo para cada conjunto de sondas fueron *Hes1* (Hs00172878\_ml), *ACTB* (4333762F), IL-6 (Hs00174131\_m1), IL-8 (Hs00174103\_m1) y *18S* (4319413E). Como se ve a partir de los resultados (véase la Figura 3), las células H460a expresan cantidades más elevadas de ARNm de IL-6 y de IL-8 que las otras líneas celulares ensayadas, incluyendo 12 veces más de ARNm de IL-6 y 8 veces más de ARNm de IL-8 en comparación con las células A549.

25

30

#### Ejemplo 5

Para analizar si la expresión de IL-6 o IL-8 modula la eficacia del tratamiento con el Compuesto I, se diseñaron por ingeniería genética líneas celulares A549 que sobreexpresaban IL-6 o IL-8, y se usaron para crear modelos de xenoinjerto que se estudiaron para determinar si dicha sobreexpresión alteraba la sensibilidad de las células hacia el tratamiento con Compuesto I.

35

Se crearon lentivirus de IL-6 e IL-8 usando plásmidos de IL-6 e IL-8 (disponibles en Genecopoeia, Rockville, Maryland, EE.UU.), respectivamente. Se repartieron las células A549 en tres grupos, recibiendo un grupo un vector de control, siendo un grupo infectado con el lentivirus de IL-6 y siendo el tercer grupo infectado con el lentivirus de IL-8. Los dos últimos grupos formaron combinaciones de células con expresión estable de IL-6 e IL-8 exógena, respectivamente.

40

Se cuantificó la sobreexpresión de la proteína IL-6 e IL-8 por ELISA. Véase la Figura 4. Las células A549 que sobreexpresaron IL-6 secretaron 7 veces más IL-6 que H460a. Las células A549 que sobreexpresaron IL-8 secretaron ligeramente menos proteína IL-8 que H460a. Las células A549 que sobreexpresaron IL-6 o IL-8 resultaron tener una morfología similar a las células A549 de vector de control.

45

A continuación, se combinaron una parte de las células A549 que sobreexpresaron IL-6 y de las células A549 que sobreexpresaron IL-8 para formar un cuarto grupo que contenía una mezcla 1:1 de dichas células.

50

Se sembraron las células A549 que recibieron el vector de control, las células A549 que sobreexpresaron IL-6, las células A549 que sobreexpresaron IL-8 y una mezcla 1:1 de células A549 que sobreexpresaron IL-6 y de células A549 que sobreexpresaron IL-8 en una placa de seis pocillos, siendo cada grupo sembrado en un pocillo a aproximadamente  $1 \times 10^5$  por pocillo el día 0. El día 4, 6, 10 y 12, se tripsinizaron todas las células y se contaron, para después volverlas a sembrar, generando una propagación adicional a la misma dilución. Las células de control se establecieron arbitrariamente como el 100 % del crecimiento. El crecimiento del resto de tipos de células se expresó como una proporción con respecto al crecimiento de las células de control. Todas las líneas celulares estudiadas mostraron una tasa de crecimiento similar. Véase la Tabla 2.

55

60

Tabla 2

	Día 0	Día 4	Día 6	Día 10	Día 12
A549_ctrl	100 ± 25	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 17
A549+IL-6	90 ± 5	109 ± 6	112 ± 20	98 ± 5	97 ± 6

	Día 0	Día 4	Día 6	Día 10	Día 12
A549+IL-8	84 ± 12	91 ± 12	118 ± 6	77 ± 6	78 ± 4
A549+IL-6y8	64 ± 14	74 ± 14	72 ± 17	71 ± 1	77 ± 5

Se evaluó el efecto *in vivo* de la sobreexpresión de IL-6 e IL-8 en la eficacia del Compuesto I para cada uno de estos grupos de células.

- 5 Se usaron las células de los cuatro grupos anteriormente mencionados, y las células A549 y H460a parentales para crear modelos de xenoinjerto usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Se distribuyeron los ratones aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento (10 ratones/grupo): ratones de A549 parentales que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de A549 parentales que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de A549 parentales que recibieron Taxol® a 30 mg/kg cuatro veces al día, ratones de A549 de vector de control que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de A549 de vector de control que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de A549 de vector de control que recibieron Taxol® a 30 mg/kg cuatro veces al día, ratones de A549 que sobreexpresaban IL-6 que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de A549 que sobreexpresaban IL-6 que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de A549 que sobreexpresaban IL-6 que recibieron Taxol® a 30 mg/kg cuatro veces al día, ratones de A549 que sobreexpresaban IL-8 que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de A549 que sobreexpresaban IL-8 que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de A549 que sobreexpresaban IL-8 que recibieron Taxol® a 30 mg/kg cuatro veces al día, ratones de A549 que contenían una mezcla 1:1 de xenoinjerto de células A549 que sobreexpresaban IL-6 e IL-8 que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de A549 que contenían una mezcla 1:1 de xenoinjerto de células A549 que sobreexpresaban IL-6 e IL-8 que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día y ratones de A549 que contenían una mezcla 1:1 de xenoinjerto de células A549 que sobreexpresaban IL-6 e IL-8 que recibieron Taxol® a 30 mg/kg cuatro veces al día, ratones de H460a que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de H460a que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día y ratones de H460a que recibieron Taxol® a 30 mg/kg cuatro veces al día.

Los tumores de xenoinjerto de H460a (altos niveles tanto de IL-6 como de IL-8) tratados con 10 mg/kg de Compuesto I una vez al día produjeron una ICT del 9 % tras 21 días. Esta resistencia resultó estar en claro contraste con la ICT del 71 % observada para los tumores de A549 y la ICT del 61 % observada para los tumores de vector de control de A549 (nivel bajo tanto de IL-6 como de IL-8) coherente con los experimentos anteriores. La sobreexpresión de IL-6 o IL-8 en A549 redujo la ICT hasta el 32 % y 45 %, respectivamente. Los tumores iniciados con una mezcla 1:1 de A549 que sobreexpresaban IL-6 o IL-8 demostraron una total resistencia al Compuesto I (ICT del 8 %), en línea con la resistencia del xenoinjerto de H460a parental. El Taxol® se incluyó como control de fármaco positivo que mostraba una ICT uniforme en los diversos modelos. Véase la Figura 5.

La resistencia hacia el Compuesto I de A549 que sobreexpresaban IL-6 o IL-8 no fue causada por una pérdida de la inhibición de Notch, pues la regulación negativa del ARNm de *Hes1* tras el tratamiento *in vitro* con Compuesto I, la evidencia del bloqueo de la señalización de Notch, se mantuvo adecuadamente en estas células.

#### 40 Ejemplo 6

El presente ejemplo describe un estudio realizado para investigar si se requiere la expresión de IL-8 para el mantenimiento de la resistencia de las células H460a.

45 Se crearon lentivirus usando ARNhc anti-IL-8 basado en pLKO.1 (adquirido en Open Biosystems) y se usaron para anular de forma estable la expresión de IL-8 en células H460a. Como se muestra en la Figura 6, el ARNhc dio una anulación del 75 % de la expresión de IL-8 (tanto de ARNm como de proteína), en comparación con las células H460a parentales. Sin embargo, las células H460a con la expresión de IL-8 anulada seguían teniendo niveles de IL-8 más de 2 veces superiores en comparación con las células A549.

50 A continuación, se implantaron las células H460a parentales y las células H460a con la expresión de IL-8 anulada como xenoinjertos en ratones usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Se distribuyeron los ratones aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento (10 ratones/grupo): ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron vehículo una vez al día, ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de xenoinjerto de H460a con la expresión de IL-8 anulada que recibieron vehículo una vez al día y ratones de xenoinjerto de H460a con la expresión de IL-8 anulada que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día.

Como se muestra en la Figura 7, cuando se trataron con el Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día durante 21 días, los tumores derivados de las células H460a con la expresión de IL-8 anulada mostraron una mejor capacidad de respuesta en comparación con los tumores de células H460a parentales (ICT del 5 % frente a ICT del 24 %).

#### 5 Ejemplo 7

El presente ejemplo describe un estudio adicional realizado para investigar si se requiere la expresión de IL-8 para el mantenimiento de la resistencia de las células H460a.

10 El anticuerpo anti-IL-8 neutralizante se adquirió en R&D Systems (número de catálogo: MAB208). Este anticuerpo se ensayó primero *in vitro*, sin que se observara inhibición del crecimiento en las células H460a tratadas con dicho anticuerpo.

15 Se crearon modelos de xenoinjerto de H460a usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se distribuyeron los ratones aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento (10 ratones/grupo): ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron vehículo dos veces a la semana, ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron anticuerpo anti-IL-8 a 20 mg/kg dos veces a la semana y ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día y anticuerpo anti-IL-8 a 20 mg/kg dos veces a la semana.

20 La combinación del anticuerpo con el Compuesto I mejoró la sensibilidad de los tumores de H460a hacia el Compuesto I (ICT del 10 % frente a ICT del 43 %). Esto es coherente con los datos anteriores obtenidos utilizando ARNhc de IL-8. Véase la Figura 8.

#### 25 Ejemplo 8

El presente ejemplo describe un estudio realizado para investigar si se requiere la expresión de IL-6 para el mantenimiento de la resistencia de las células H460a.

30 El anticuerpo anti-IL-6 neutralizante se adquirió en R&D Systems (número de catálogo: MAB2061). Este anticuerpo se ensayó primero *in vitro*, sin que se observara inhibición del crecimiento en las células H460a tratadas con dicho anticuerpo.

35 Se crearon modelos de xenoinjerto de H460a usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se distribuyeron los ratones aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento (10 ratones/grupo): ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron vehículo dos veces a la semana, ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día, ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron anticuerpo anti-IL-6 a 20 mg/kg dos veces a la semana y ratones de xenoinjerto de H460a que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día y anticuerpo anti-IL-6 a 20 mg/kg dos veces a la semana.

40 La combinación del anticuerpo con el Compuesto I mejoró la sensibilidad de los tumores de H460a hacia el Compuesto I (ICT del 43 % frente a ICT del 47 %). Véase la Figura 9.

#### 45 Ejemplo 9

Un aspecto importante de cualquier marcador de respuesta es la capacidad de identificar satisfactoriamente de manera prospectiva los tipos de tumores respondedores y no respondedores. En el presente ejemplo, se analizaron diferentes líneas celulares para determinar si tenían un alto nivel de expresión de IL-6 y/o IL-8. A continuación, se crearon xenoinjertos usando células que expresaban altos niveles de IL-6 e IL-8 (y, por lo tanto, predichas como no respondedores al tratamiento con Compuesto I). Luego, se trataron los modelos de xenoinjerto con el Compuesto I para ver si los altos niveles de IL-6 e IL-8 tenían algún efecto en la eficacia del tratamiento.

50 Se exploró aproximadamente un centenar de líneas celulares de múltiples tipos de tumores en cuanto a la expresión de IL-6 e IL-8 mediante qRT-PCR. Aproximadamente el 13 % de las líneas celulares resultó tener una expresión de IL-6 e IL-8 al menos 10 veces superior a la de A549. Se seleccionaron dos líneas celulares, U87MG (glioblastoma), que expresa altos niveles de IL-6 (ARNm de IL-6 35 veces superior al de A549) e IL-8 (ARNm de IL-8 85 veces superior al de A549), y LOX (melanoma), que expresa niveles más altos de IL-8 (ARNm de IL-8 50 veces superior al de A549) e IL-6 (ARNm de IL-6 2 veces superior al de A549) con relación a A549 (Figura 10), para su posterior estudio. El mayor nivel de expresión de IL-6 y/o IL-8 de estas dos líneas celulares se confirmó además mediante ELISA (Figura 11).

Las líneas celulares de cáncer humano U87MG y LOX se adquirieron en la colección americana de cultivos tipo.

Luego, se crearon los modelos de xenoinjerto usando las líneas celulares U87MG y LOX.

65

Se implantaron los xenoinjertos en ratones *nu/nu* (desnudos) hembra obtenidos en Charles River Laboratories (Wilmington, MA) (10 ratones/grupo) con aproximadamente 8 a 14 semanas de vida y un peso de aproximadamente 23 a 25 gramos. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de cuidado y uso de animales de Roche (RACUC).

Para el implante de los xenoinjertos, se recogieron las células usando tripsina al 0,05 %, se lavaron y se centrifugaron en medio de cultivo, y se volvieron a suspender bien en una mezcla 1:1 de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Matrigel (U87MG) o solo en PBS (LOX) a una concentración de  $1,5-5 \times 10^7$  células por ml. Se implantó un volumen de 0,2 ml de suspensión celular ( $5 \times 10^6$  células para U87MG,  $2 \times 10^6$  células para LOX) por ratón subcutáneamente en el flanco derecho. Se dejaron crecer los tumores durante 8 a 26 días después del implante hasta que el volumen medio alcanzó -100-150 mm<sup>3</sup>, tras lo que los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento: ratones de xenoinjerto de U87MG que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día, ratones de xenoinjerto de U87MG que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día durante 21 días, ratones de xenoinjerto de LOX que recibieron vehículo (Klucel y Tween) una vez al día y los ratones de xenoinjerto de LOX que recibieron Compuesto I a 10 mg/kg una vez al día durante 11 días.

Ambos modelos de U87MG y LOX resultaron ser resistentes al tratamiento con el Compuesto I según lo predicho, con una ICT del -17 % para los tumores de U87MG y una ICT del 15 % para los tumores de LOX. Véase la Figura 12.

La resistencia de las células U87MG y LOX al Compuesto I no estuvo causada por una pérdida de la inhibición de Notch, pues la regulación negativa del ARNm de *Hes1* tras el tratamiento *in vitro* con el Compuesto I, evidencia del bloqueo de la señalización de Notch, se mantuvo adecuadamente en estas células. Véase la Figura 13.

#### Ejemplo 10

Se midieron los niveles de IL-6 e IL-8 en suero en modelos de xenoinjerto para determinar si reflejan las diferencias de expresión observadas *in vitro* en los medios celulares. Los datos resultantes sugieren que la recogida de suero podría ser una metodología clínicamente viable para el seguimiento de los niveles de IL-6 e IL-8 en los tumores de pacientes.

Se recogieron sueros murinos de ratones portadores de tumores usando los siguientes modelos de xenoinjerto: A549, H460a, H460a con la expresión de IL-8 anulada, U87MG y LOX (los modelos se produjeron usando los métodos descritos anteriormente). Esto se realizó mediante sangrado retro-orbital o punción cardiaca en tubos separadores de suero BD Microtainer (Nº de catálogo: 365956, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se dejó coagular la sangre durante un mínimo de 10 minutos y se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 minutos en un microcentrifugador. Se recogió el suero y se colocó en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml, que almacenaron a -80 °C.

La IL-6 y la IL-8 humanas secretadas en los sueros murinos de tumores de A549 fueron demasiado bajas para su detección mediante ELISA. Sin embargo, la IL-6 y la IL-8 humanas procedentes de modelos de xenoinjerto de H460a, LOX y U87MG se detectaron fácilmente en el suero mediante ELISA (Figura 14). Además, se observaron los cambios esperados en los niveles de IL-8 en suero secretados entre el modelo de H460a con la expresión de IL-8 anulada y el modelo de H460a.

En general, los niveles de IL-6 e IL-8 observados *in vivo* en el suero fueron un reflejo de las cantidades observadas *in vitro* en los cultivos celulares. Sin embargo, se observó cierta discrepancia entre la IL-6 y la IL-8 medidas en los sueros murinos y las medidas en los medios celulares. Por ejemplo, las células U87MG secretaron niveles de IL-6 e IL-8 de 5 a 6 veces superiores a los de las H460a sembradas a los mismos números de células en plástico; esto no se reflejó en los sueros murinos.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la determinación de la resistencia de un sujeto a un tratamiento contra un trastorno proliferativo con el compuesto 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida (Compuesto I), que comprende medir el nivel de un biomarcador presente en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto, siendo dicho biomarcador IL-6 o IL-8.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un mamífero.
- 10 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho biomarcador es IL-6.
- 15 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho biomarcador es IL-8.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se miden los niveles tanto de IL-6 como de IL-8.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es sangre.
- 20 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es suero.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es orina.
- 25 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho biomarcador se mide mediante la medición de la cantidad de proteína presente en dicha muestra.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho biomarcador se mide midiendo el nivel de ARNm que codifica dicho biomarcador.
- 30 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de biomarcador presente en dicha muestra se compara con un nivel umbral para dicho biomarcador y, si es superior, se considera que dicho sujeto tiene resistencia *in vivo* al tratamiento con 2,2-dimetil-*N*-((*S*)-6-oxo-6,7-dihidro-5*H*-dibenzo[*b,d*]azepin-7-il)-*N'*-(2,2,3,3,3-pentafluoro-propil)-malonamida.
- 35 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho biomarcador es IL-6 y dicho nivel umbral para IL-6 es de aproximadamente 500 pg/ml.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho biomarcador es IL-8 y dicho nivel umbral para IL-8 es de aproximadamente 50 pg/ml.
- 40 15. Una combinación secuencial o simultánea de (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 para su uso como un medicamento, en la que el agente anti-IL-6 o el agente anti-IL-8 es un ARN antisentido, ARNh<sub>c</sub>, ARNip o anticuerpo de IL-6 o IL-8.
- 45 16. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicha combinación comprende tanto un agente anti-IL-6 como un agente anti-IL-8.
17. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en la que dicho agente anti-IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6.
- 50 18. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en la que dicho agente anti-IL-8 es un anticuerpo anti-IL-8.
19. La combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que dicho agente anti-IL-6 es un ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-6.
- 55 20. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-6 es un ARN antisentido.
- 60 21. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica IL-6 es un ARNh<sub>c</sub> o un ARNip.
22. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, 16 o 18, en la que dicho agente anti-IL-8 es un ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica la IL-8.
- 65

23. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en la que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica la IL-8 es un ARN antisentido.
- 5 24. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en la que dicho ácido nucleico que interfiere en la expresión de un ácido nucleico que codifica la IL-8 es un ARNhc o un ARNip.
25. Un kit que comprende: (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 como se ha definido en la reivindicación 15.
- 10 26. El uso de una combinación de (A) Compuesto I; y (B) un agente anti-IL-6 y/o anti-IL-8 como se ha definido en la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en particular, de cáncer.

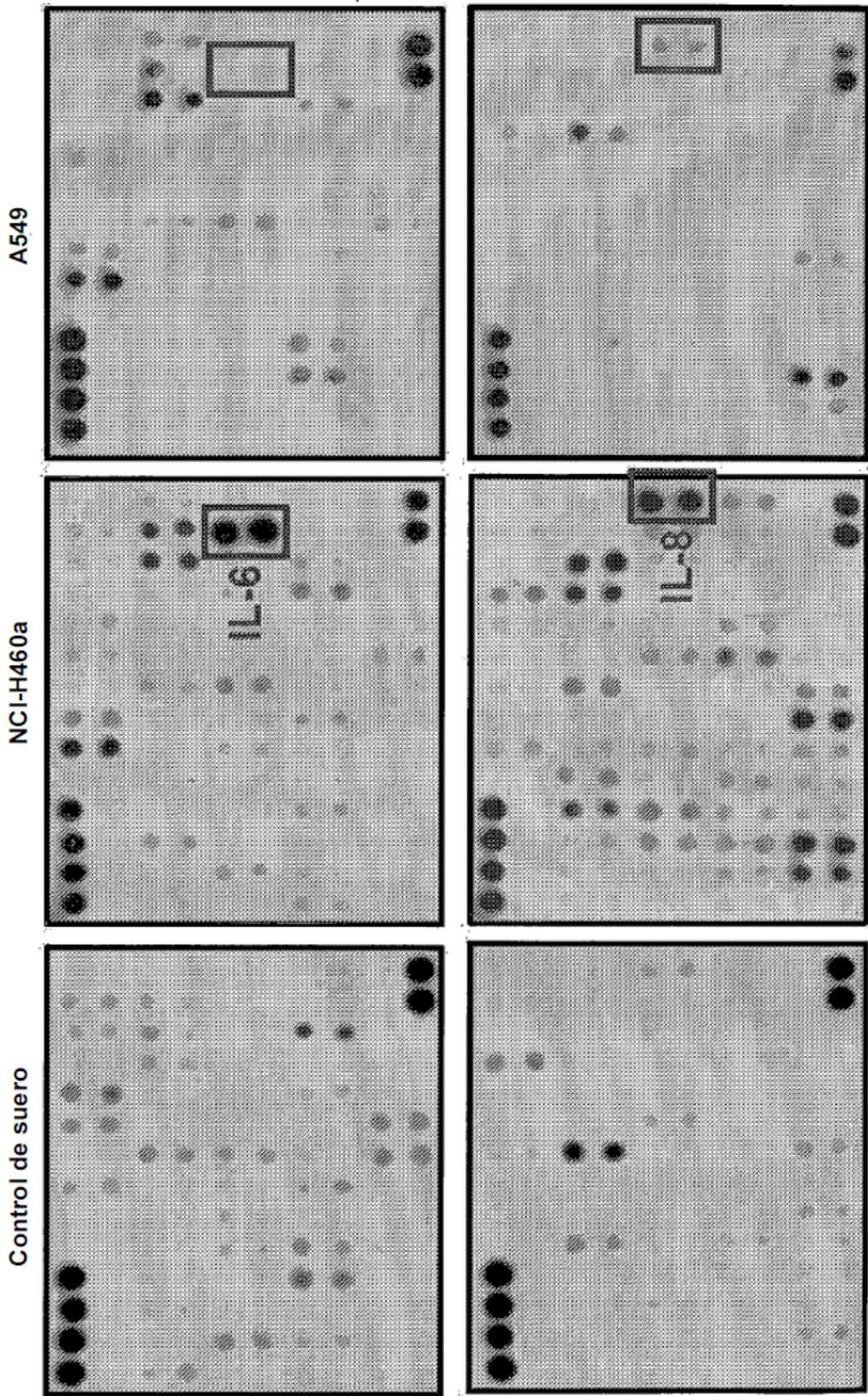


Figura 1

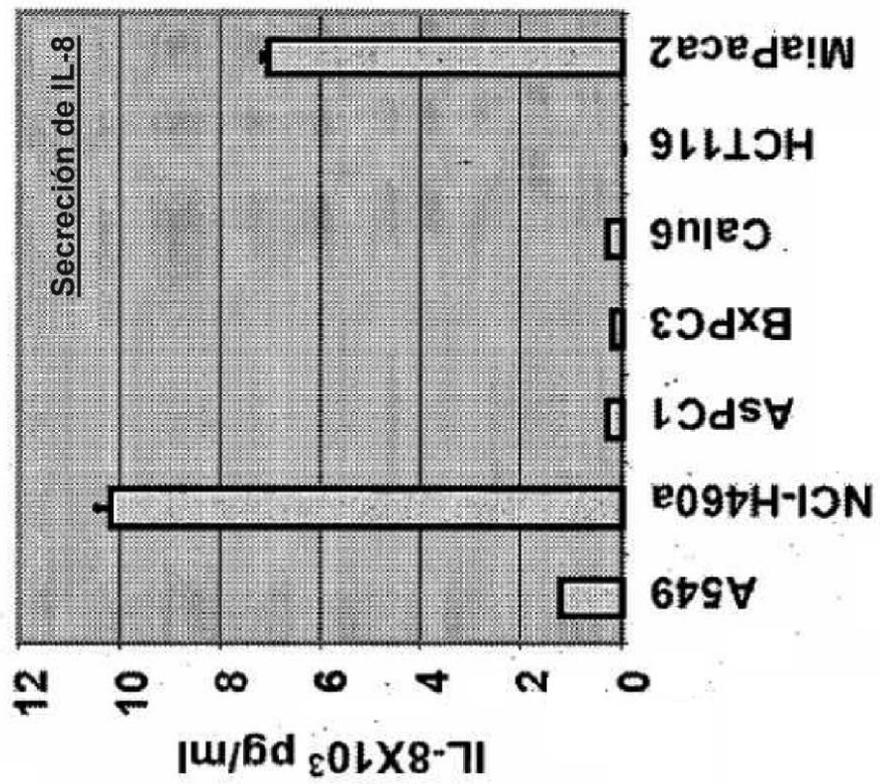
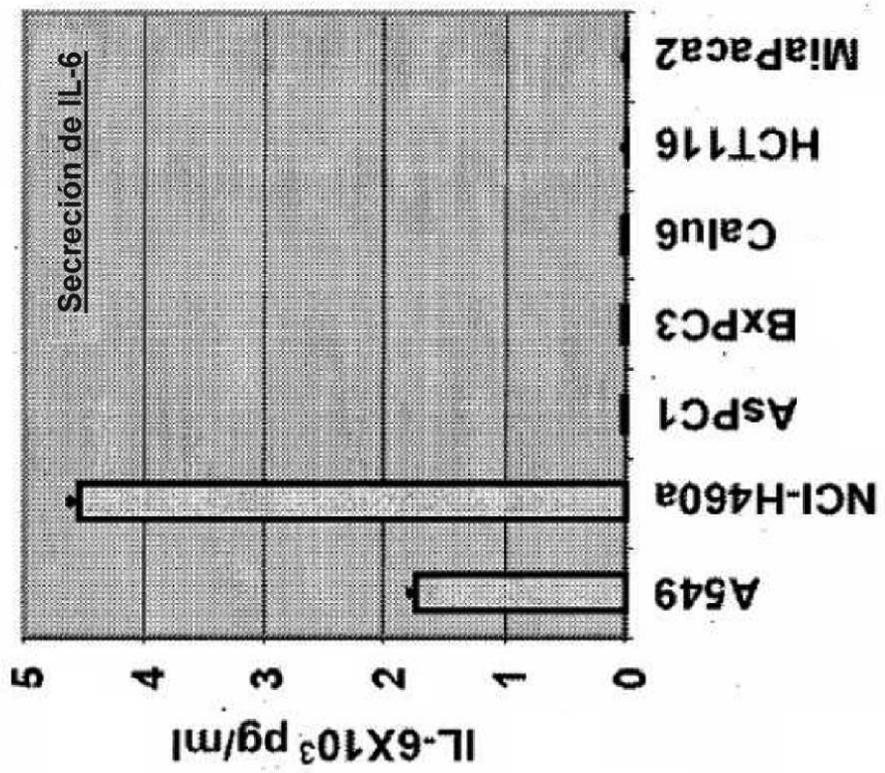


Figura 2



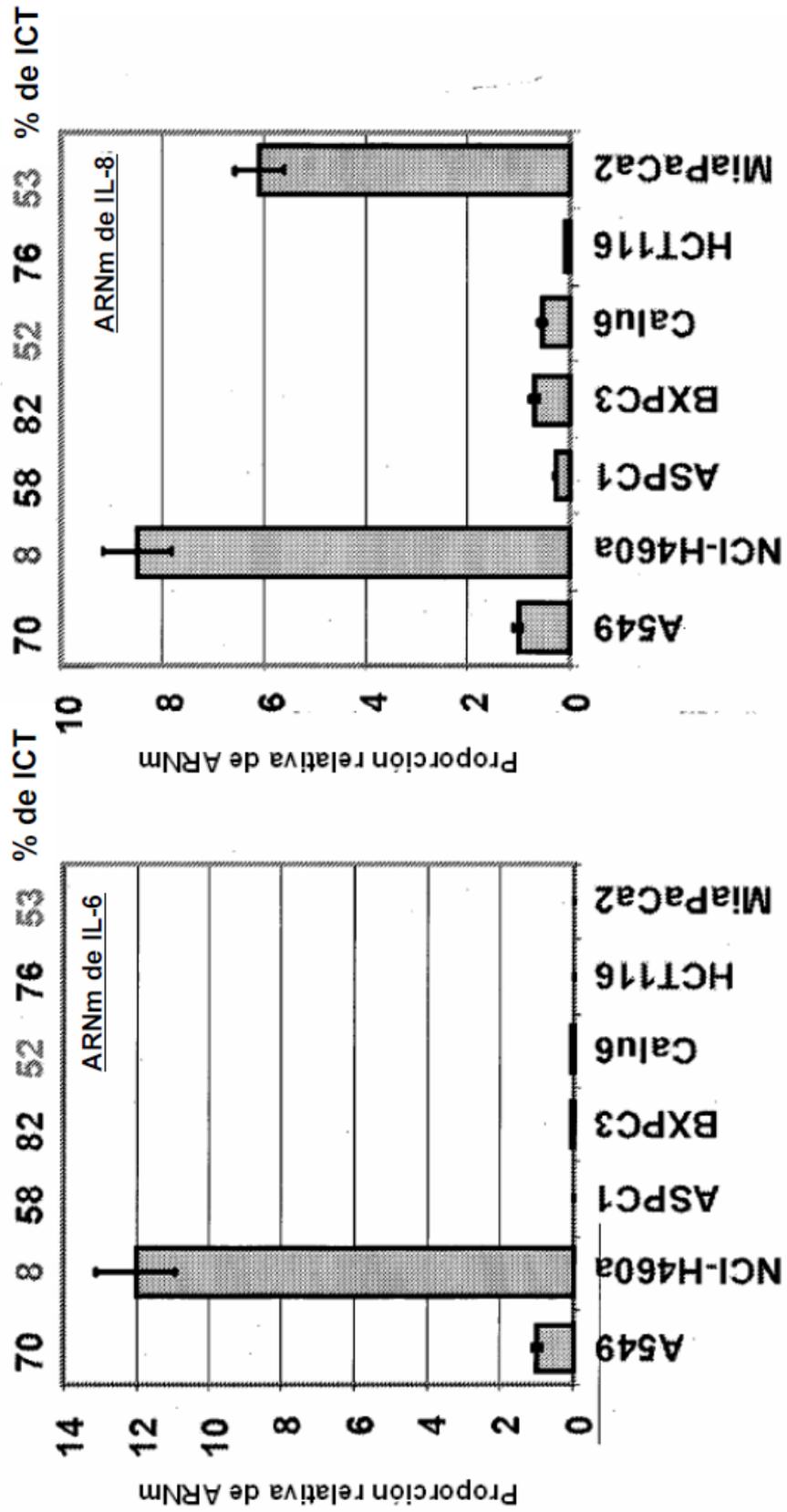


Figura 3

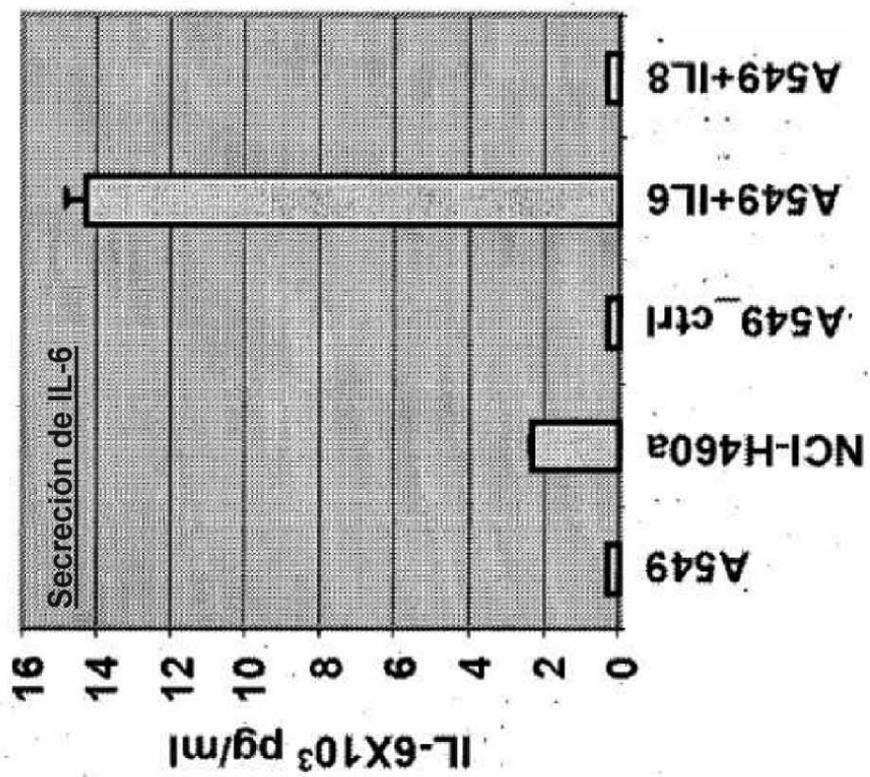
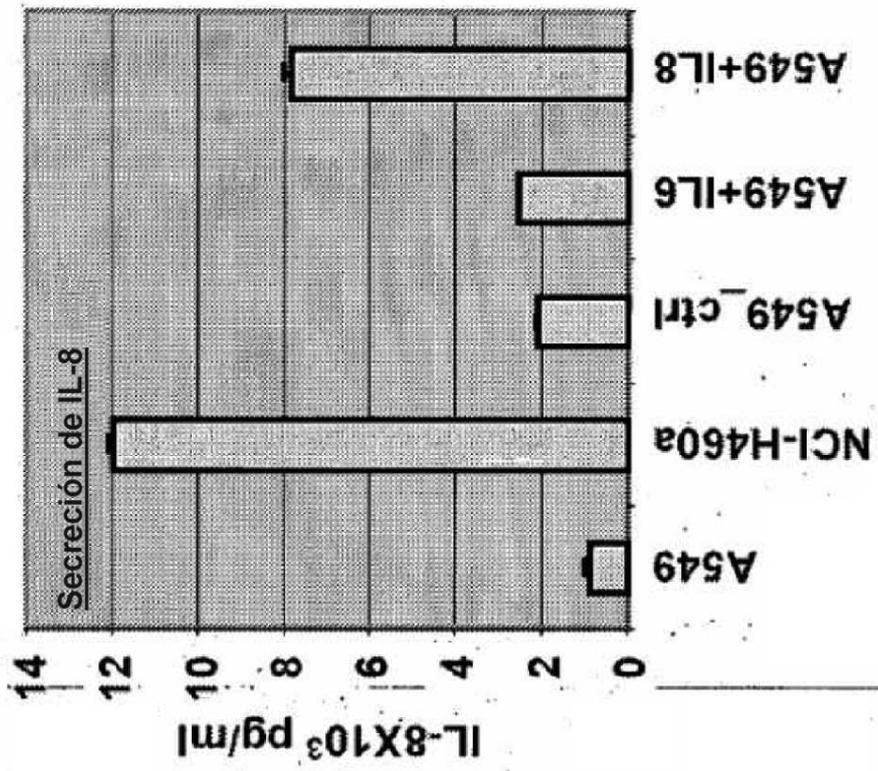


Figura 4



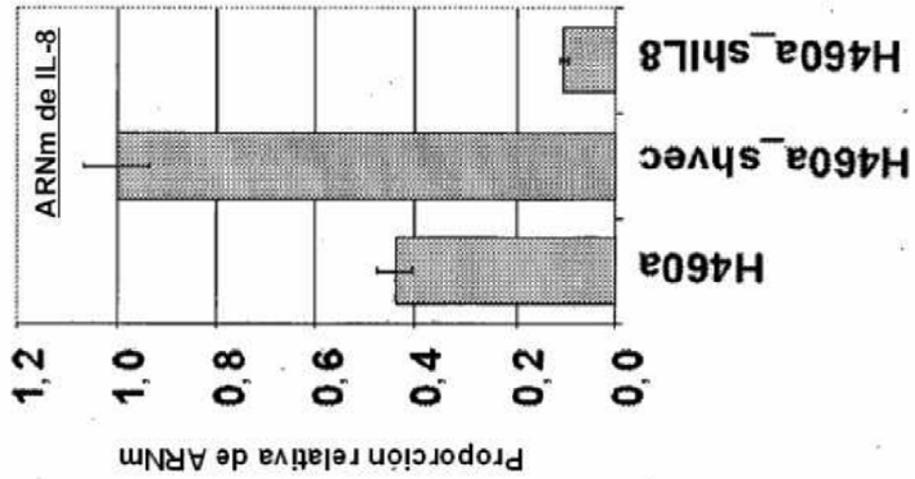
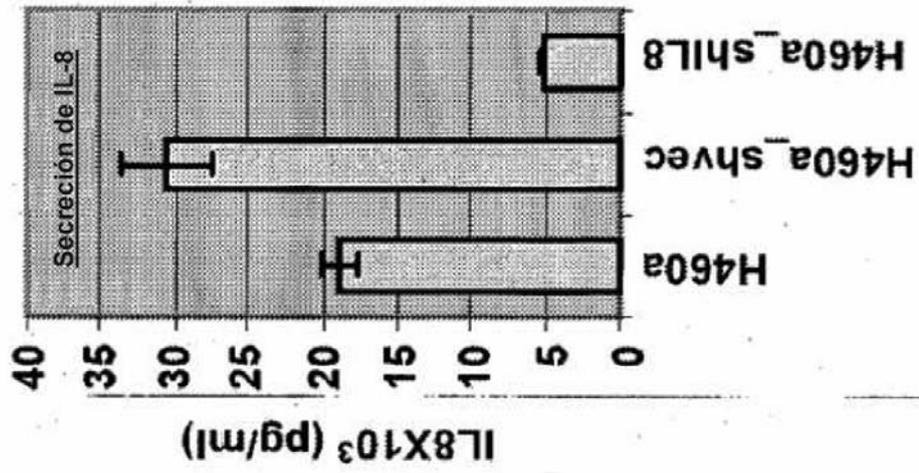


Figura 6

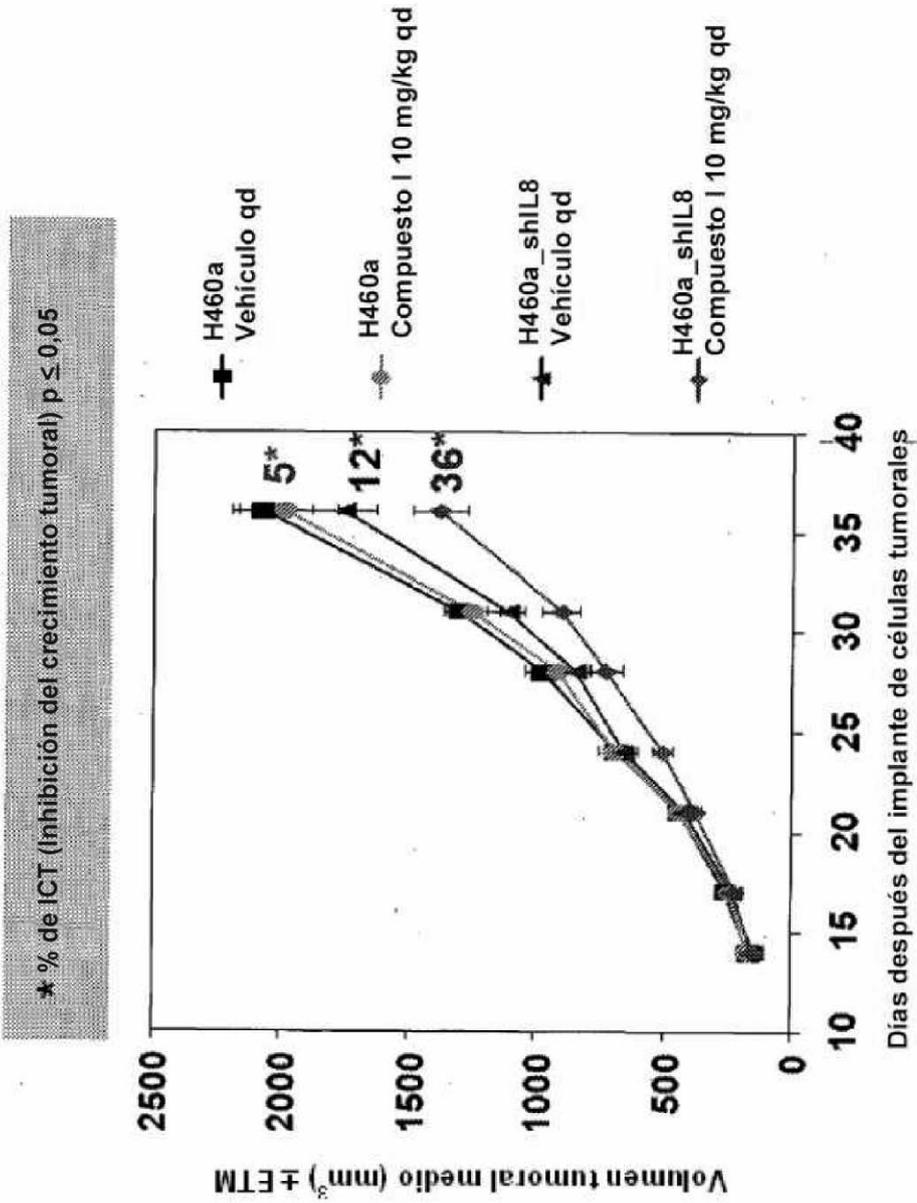


Figura 7

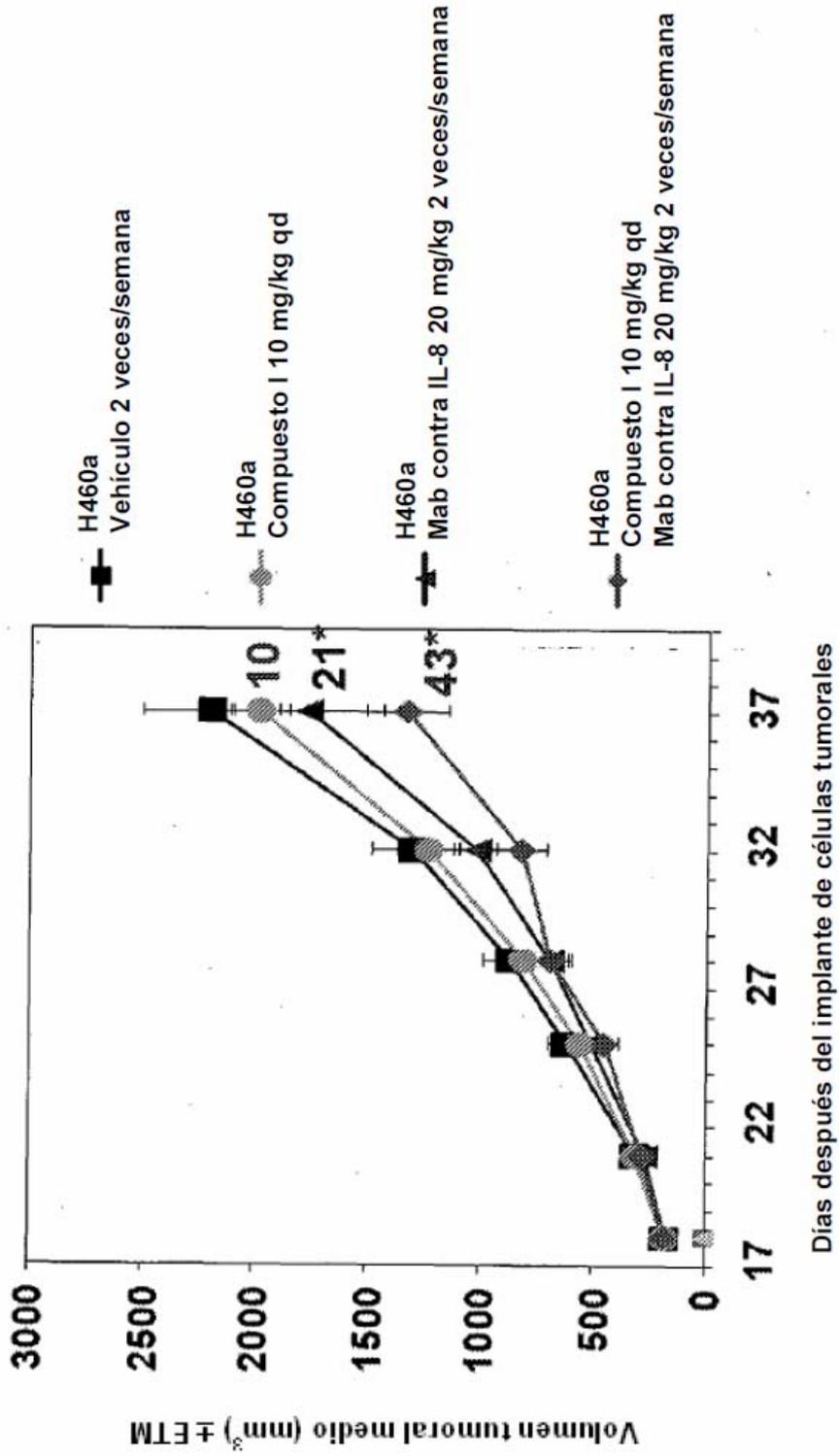


Figura 8

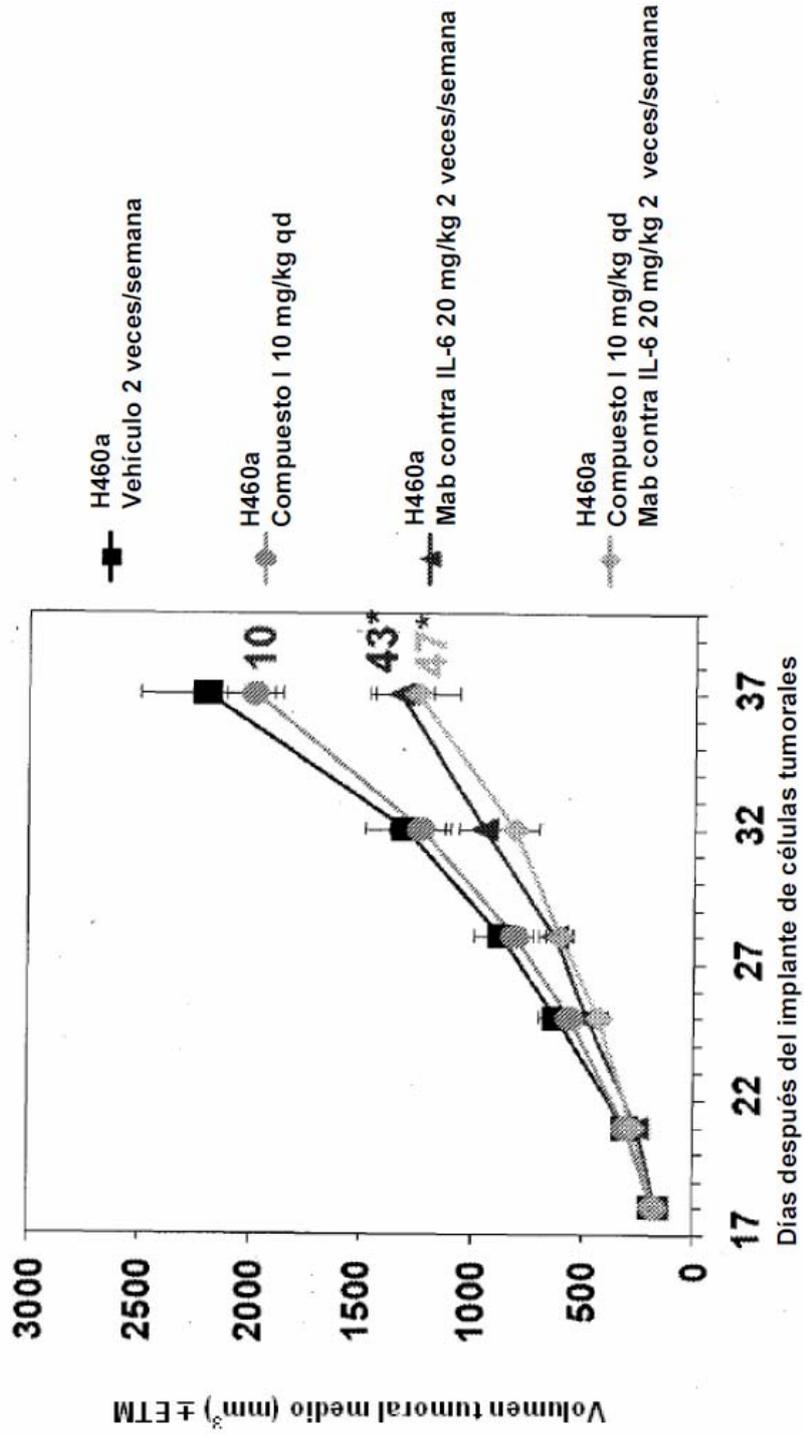


Figura 9

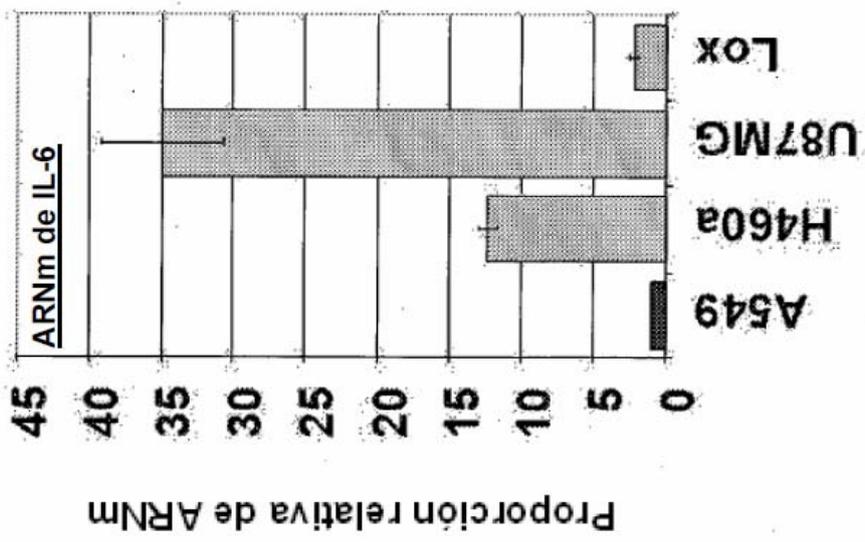
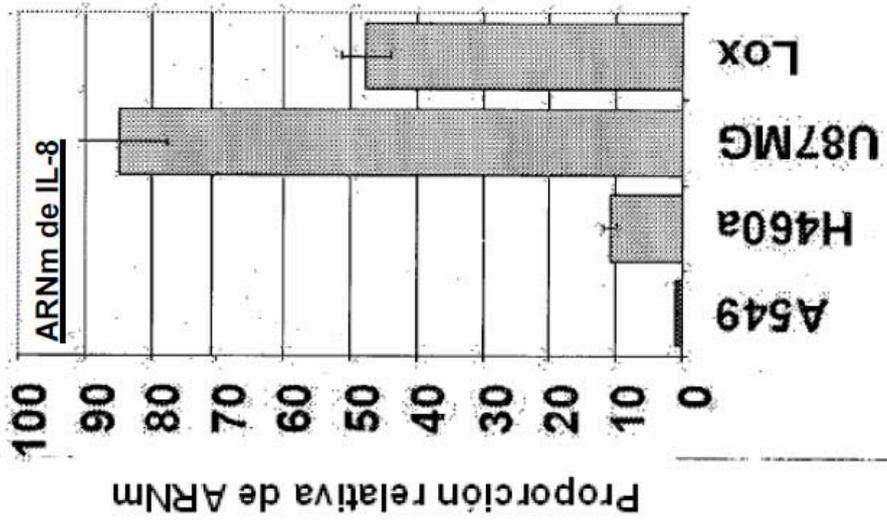


Figura 10

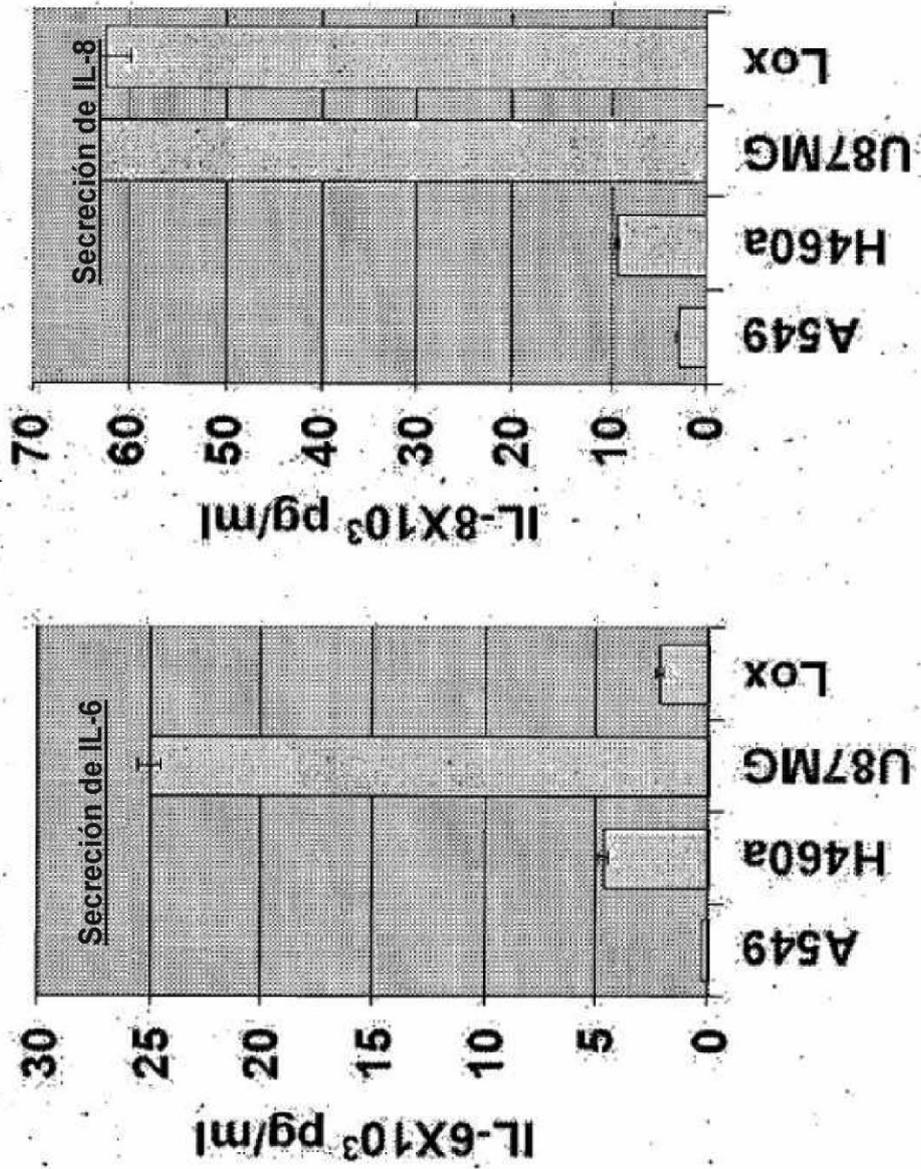


Figura 11

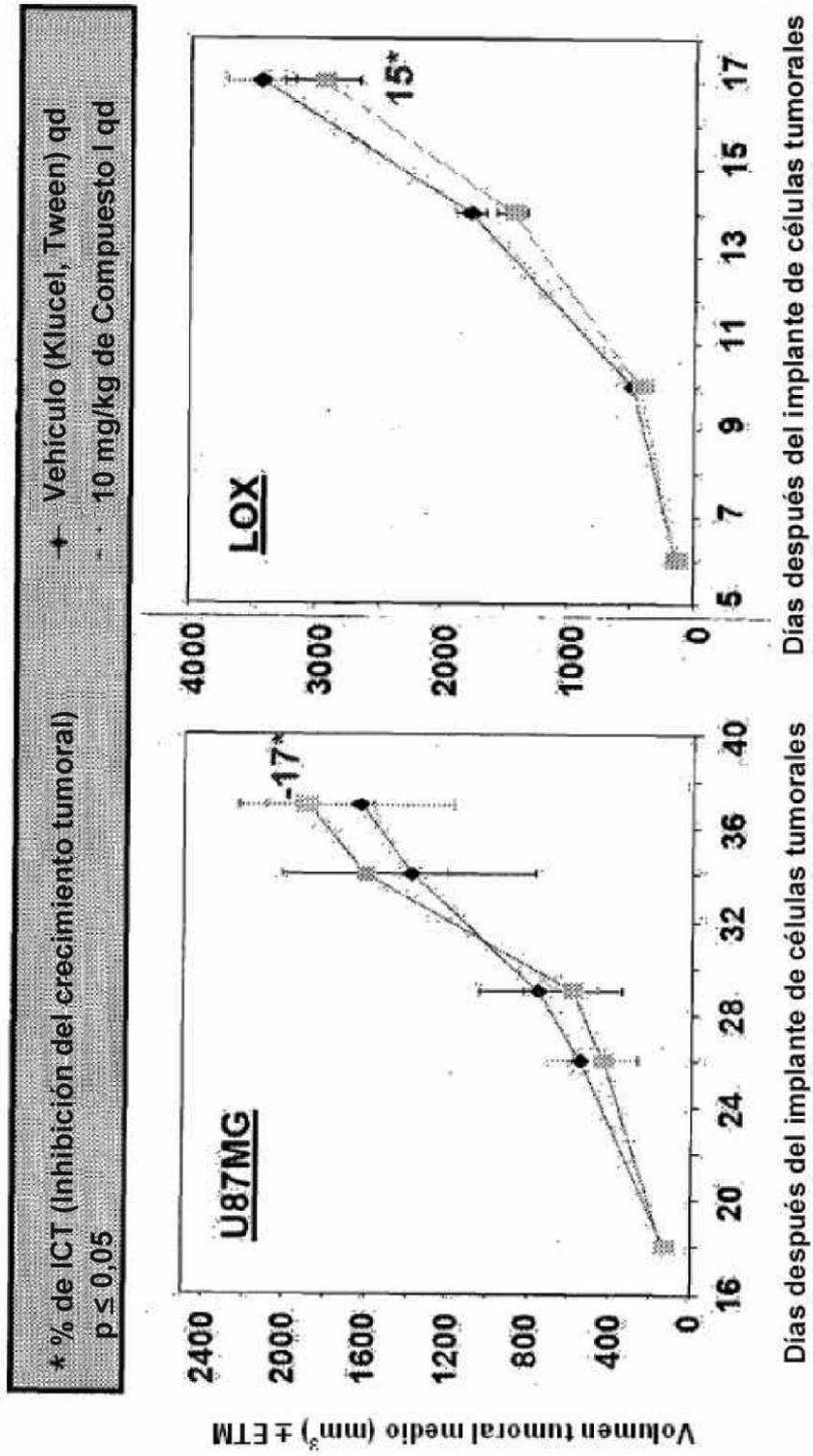


Figura 12

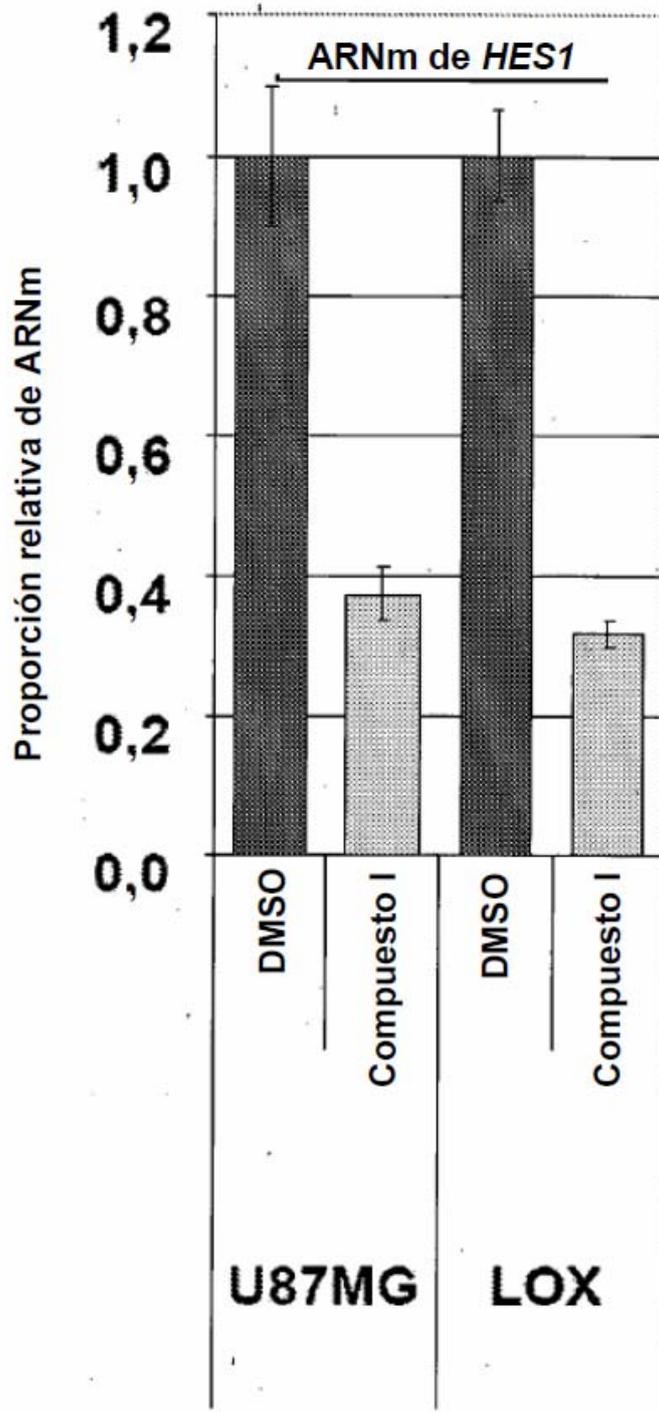


Figura 13

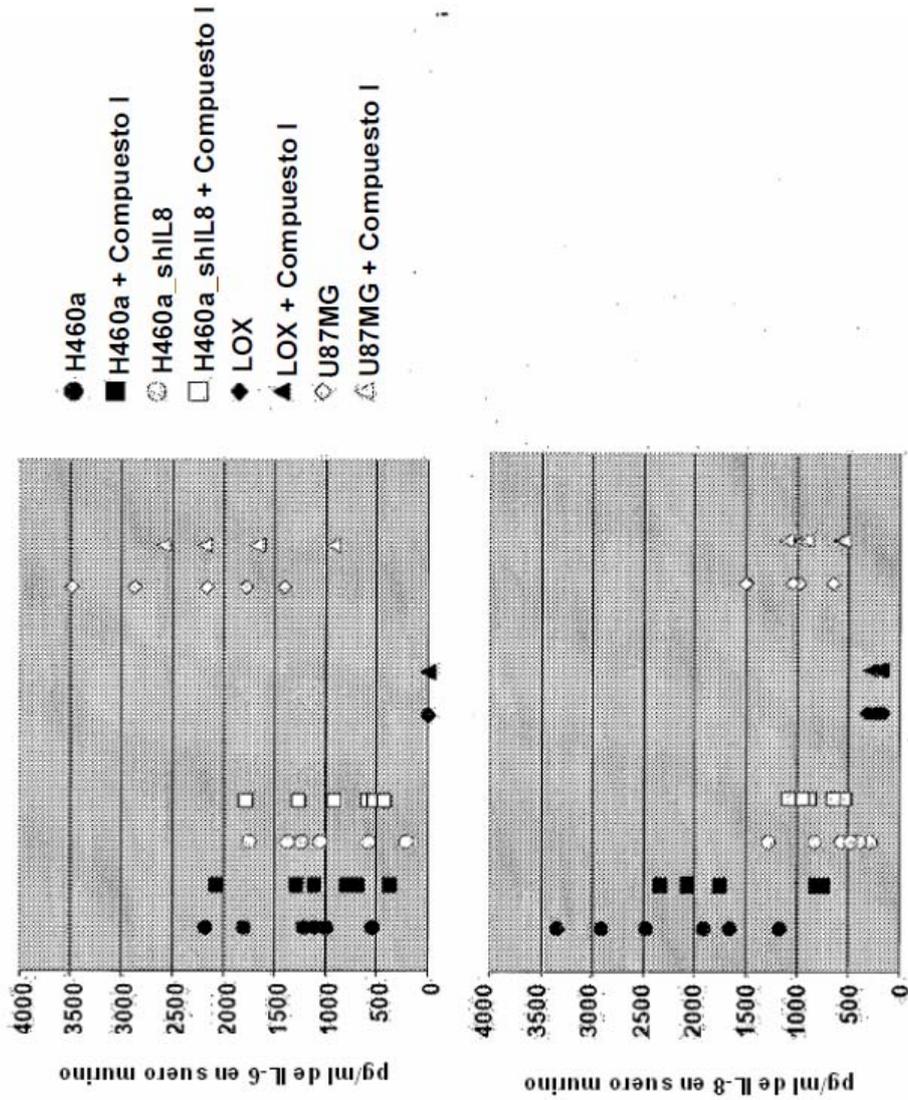


Figura 14