



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 327 313**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/155 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00975725 .3**

(96) Fecha de presentación : **16.11.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1231910**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

(54) Título: **Pentamidina para el tratamiento del cáncer.**

(30) Prioridad: **16.11.1999 US 165688 P**

(73) Titular/es: **Oncozyme Pharma Inc.
6252 des Galleries d'Anjou Blvd.
Anjou, Quebec H1M 1V8, CA**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.10.2009

(72) Inventor/es: **Chow, Terry;
Yeh, Chiaoli;
Griller, David y
Yuen, Leonard**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.10.2009

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Pentamidina para el tratamiento del cáncer.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes de quimioterapia para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes

10 Las células cancerígenas proliferan más rápidamente que las células normales. La velocidad de mitosis y replicación del ADN es, por lo tanto, significativamente mayor en células cancerígenas. Los agentes que inhiben la replicación del ADN y la recombinación afectan a las células cancerígenas más que las células normales.

15 Muchos agentes de quimioterapia para el tratamiento del cáncer inhiben la replicación del ADN mediante la inducción de roturas en el ADN. Algunos fármacos, tales como la mitomicina, inducen roturas en el ADN en parte mediante su unión al propio ADN. Otros agentes anticancerígenos interfieren con las enzimas de topoisomerasa, que modifican la estructura del ADN. Al hacer esto, induce roturas de cadenas. Normalmente, las roturas son transientes, pero en presencia de un inhibidor de enzima de topoisomerasa, tal como etopósido, las roturas son vividas más tiempo 20 y exponen el ADN a un daño permanente.

25 Los organismos vivos reparan el ADN mediante una variedad de mecanismos que incluyen un sistema de reparación de excisiones. Las enzimas que median en la reparación de la excisión cortan el ADN dañado. Entonces reemplazan las secuencias de ADN dañado con las secuencias correctas. Este sistema de reparación disminuye la eficiencia de las terapias contra el cáncer que dependen de la quimioterapia que induce las roturas del ADN. La pérdida en la eficiencia necesita el uso de altas concentraciones de quimioterapia que rompen el ADN para obtener una inhibición satisfactoria de la proliferación del cáncer. Estas quimioterapias son muy tóxicas y tienen efectos secundarios 30 dañinos. La necesidad de usar altas concentraciones es un inconveniente significativo.

35 Se ha sugerido que la endo-exonucleasa puede funcionar en la reparación del ADN y la recombinación. La patente US 5.324.830 de Resnick *et. al.* describe el aislamiento de un segmento de ADN que codifica una endo-exonucleasa, RhoNuc de *S. cerevisiae*. La patente US 5.489.524 describe la caracterización de un gen para endo-exonucleasa de mamífero y el aislamiento de endo-exonucleasa de primate. Sin embargo, no se ha sugerido previamente que la inhibición de la actividad de la endo-exonucleasa sea efectiva para inhibir el proceso de reparación del ADN o la proliferación 40 de células cancerígenas.

En Pérez *et al.*, la unión de Pt-pentamidina (pentamidina platino) ha mostrado que causa una fuerte estabilización de la doble hélice de ADN nucleosomal hasta la desnaturalización por calor. Además, en complejos de nucleosoma: Pt-pentamidina el ADN nucleosomal desnaturalizado puede reasociarse a 71°C.

45 En la patente US 5.204.352, se proporcionaron compuestos que presentaban un alto nivel de actividad antiparasitaria, especialmente contra parásitos del género *Trypanosoma*. Los compuestos comprendían sales heteroaromáticas cuaternarias aril-sustituidas. Se sugirió que los compuestos de esta patente serían competitivos con pentamidina en el tratamiento de la tripanosomiasis. La patente US 5.084.480 describe sales de pentamidina, formulaciones que contienen estas sales y el uso de estas sales para el tratamiento de profilaxis o *Pneumocystis carinii*. Se describen el gluconato de pentamidina y el lactonato como que tienen una alta solubilidad en agua, mientras proporcionan alternativas potencialmente menos tóxicas al isetonato de pentamidina.

50 En Tuan *et al.*, la pentamidina se utilizó en pacientes de trasplante de médula ósea que sufren neumonitis *Pneumocystis carinii*. En Waalkes *et al.*, se estudiaron los pacientes con enfermedades malignas complicadas mediante neumonía intersticial difusa debido a la *Pneumocystis carinii* probada o sospechosa a los que se les dio pentamidina durante la terapia. Después de la administración intramuscular de pentamidina, los niveles de plasma eran bajos y la excreción urinaria prolongada. Después de una única inyección intraperitoneal en ratones, los niveles de distribución del tejido y el diseño de excreción para la pentamidina se determinaron en varios intervalos de tiempo. Hubo almacenamiento del fármaco en tejidos y la excreción se retrasó. La concentración más alta de pentamidina se encontró en el riñón.

55 Existe una necesidad de compuestos que inhiban la proliferación de células cancerígenas que sean menos tóxicas que la quimioterapia convencional. Existe la necesidad tradicional de compuestos que inhiban la reparación del ADN para inhibir la proliferación de las células cancerígenas. También existe la necesidad de compuestos que se puedan utilizar en combinación con la quimioterapia convencional para mejorar la eficiencia del tratamiento contra el cáncer. También existe la necesidad de que estos compuestos utilicen en combinación con quimioterapia convencional, de manera que la combinación permita el uso de dosis menores de quimioterapia a los pacientes de cáncer sin pérdida de la eficiencia terapéutica.

65 Descripción de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que las células cancerígenas tienen concentraciones mayores de endo-exonucleasa que las células normales. La proliferación de células cancerígenas y el crecimiento de tumores se

pueden inhibir mediante la inhibición de la actividad de la endo-exonucleasa. El cáncer también se puede diagnosticar basado en las concentraciones elevadas de endo-exonucleasa en las células cancerígenas.

La proliferación de las células cancerígenas de crecimiento de tumores, por lo tanto, se puede inhibir administrando a pacientes compuestos que inhiban la actividad de la endo-exonucleasa.

Los compuestos que inhiben la actividad de la endo-exonucleasa se pueden proporcionar en combinación con quimioterapia convencional que provoca rupturas en el ADN, para inhibir la proliferación de células cancerígenas del crecimiento de tumores. La proliferación de las células cancerígenas y el crecimiento de tumores, por lo tanto, se pueden inhibir mediante la administración a un paciente de un compuesto que inhiba la actividad de la endo-exonucleasa en combinación con fármacos de quimioterapia convencional que provocan roturas en el ADN. Los compuestos que inhiben la actividad de la endo-exonucleasa, por lo tanto, se pueden utilizar en combinación con agentes que provocan roturas en el ADN para inhibir la proliferación de células cancerígenas y el crecimiento de tumores.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para inhibir la proliferación de células cancerígenas y el crecimiento de tumores que comprende pentamidina y un compuesto que induce roturas en las cadenas de ADN, seleccionado entre el grupo que consiste en cisplatino, mitomicina C, adriamicina y etopósido.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una utilización de la pentamidina en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación de células cancerígenas o para inhibir el crecimiento de tumores en un paciente.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de pentamidina en combinación con un compuesto que induce roturas en las cadenas de ADN seleccionado entre el grupo que consiste en cisplatino, mitomicina C, adriamicina, etopósido e irradiación de ionización en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación de células cancerígenas y para inhibir el crecimiento de tumores en un paciente.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de un anticuerpo en endo-exonucleasa para la preparación de un agente para el diagnóstico de cáncer en un paciente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico de barras que muestra el nivel de endo-exonucleasa en varias líneas celulares;

La figura 2 es un gráfico que muestra la supervivencia de varias células en presencia de diferentes cantidades de pentamidina utilizando un ensayo clonogénico;

La figura 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto de combinación de diferentes fármacos (mitomicina C + pentamidina, etopósido + pentamidina) sobre la muerte celular;

La figura 4 es un gráfico de barras que muestra el efecto de combinación de cisplatino y pentamidina sobre la muerte celular;

La figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de un implante de polímero de pentamidina sobre el crecimiento de tumores en el modelo de ratón de tumor RIF;

La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de combinación del implante de polímero de pentamidina y la irradiación sobre el crecimiento de tumores en un modelo de ratón de tumor RIF;

La figura 7 es un gráfico que muestra el efecto de la pentamidina sobre el crecimiento de un tumor primario en el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis en ratones;

La figura 8 es un gráfico que muestra la toxicidad de la pentamidina administrada mediante una vía intraperitoneal;

La figura 9 es un gráfico que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina *en vivo*;

La figura 10 es un gráfico que muestra el efecto contra el cáncer que la pentamidina y el cisplatino tanto de manera individual como en combinación *en vivo*;

La figura 11 es un gráfico que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina y el cisplatino tanto individualmente como en combinación *en vivo*;

La figura 12 es un gráfico que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina y el cisplatino tanto individualmente como en combinación *en vivo*;

ES 2 327 313 T3

La figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de la pentamidina en el crecimiento de tumores primarios de carcinoma de pulmón de Lewis;

5 La figura 14a es un gráfico que muestra el efecto contra cáncer de la pentamidina y el cisplatino tanto individualmente como en combinación *en vivo*;

La figura 14b es un gráfico de barras que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina y el cisplatino tanto individualmente como en combinación *en vivo*;

10 La figura 15 es un gráfico de barras que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina y el cisplatino tanto individualmente como en combinación *en vivo*;

La figura 16 un gráfico de barras que muestra el efecto de la pentamidina sobre la incidencia de la metástasis de pulmón inducida por el carcinoma de pulmón de Lewis;

15 La figura 17 es un gráfico de barras que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina y el cisplatino tanto individualmente como en combinación *en vivo*;

20 La figura 18 es un gráfico que muestra el efecto contra el cáncer de la pentamidina y la adriamicina *en vivo*;

La figura 19 es un gráfico de barras que muestra el efecto de la pentamidina y la adriamicina sobre el peso corporal para el tumor primario *en vivo*; y

25 La figura 20 es un gráfico de barras que muestra el efecto contra la metástasis de la pentamidina y la adriamicina *en vivo*.

Para los propósitos de las figuras, OP se refiere a la pentamidina, Adr se refiere a la adriamicina y CDDP se refiere al cisplatino.

30 Descripción detallada de los dibujos

La invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que la endo-exonucleasa juega un papel importante en la proliferación celular. Se requiere para crecimiento normal y para la reparación de tejido. La endo-exonucleasa juega un papel especial en células que proliferan rápidamente, tales como las células cancerígenas. Esta enzima se encuentra 35 en altas concentraciones en las células cancerígenas, donde realmente ayuda a mantener el crecimiento del tumor. La endo-exonucleasa funciona reparando las roturas en las moléculas de ADN, que llevan todos los genes para hacer funcionar las células. Las roturas del ADN a menudo se producen durante el proceso de división celular y se deben reparar si la proliferación celular continúa.

40 Se ha encontrado que los compuestos químicos que inhiben la actividad de la endo-exonucleasa inhiben la proliferación de células cancerígenas y el crecimiento de tumores. Los compuestos que inhiben la actividad de la endo-exonucleasa también se pueden utilizar en combinación con agentes que provocan roturas del ADN, preferiblemente roturas de cadena doble en el ADN. La combinación de estos tipos de compuestos u otros agentes proporciona una herramienta valiosa para la terapia contra cáncer.

45 La presente invención se refiere al resultado inesperado de que la pentamidina inhibe la actividad de la endo-exonucleasa. Se conocía previamente que la pentamidina tenía una actividad antifúngica. Se ha encontrado que la pentamidina inhibe la actividad de la endo-exonucleasa de manera suficiente para detener el crecimiento de las líneas celulares cancerígenas *in vitro*, la pentamidina también ralentiza el crecimiento de tumores en animales con cánceres 50 muy agresivos. El tratamiento contra el cáncer con pentamidina es especialmente ventajoso porque la pentamidina tiene una baja toxicidad respecto a los agentes de quimioterapia estándar. Los efectos secundarios de la pentamidina son a menudo diferentes a los de los agentes de quimioterapia estándar, de manera que cuando la pentamidina y esos agentes se utilizan juntos, el perfil de los efectos secundarios es potencialmente menos peligroso.

55 La invención también se refiere al efecto de combinación de utilizar compuestos conocidos y otros agentes que provocan roturas de cadena simple o cadena doble del ADN con pentamidina para inhibir la proliferación de células cancerígenas y el crecimiento de tumores. Se ha encontrado que los compuestos y otros agentes que provocan roturas de cadena doble del ADN trabajan especialmente bien en combinación con la pentamidina. Esto inhibe la proliferación de células y el crecimiento de tumores. Los agentes pueden provocar roturas de cadena doble directamente pueden 60 provocar roturas de cadena simple que progresan a roturas de cadena doble. Esto es común en los sistemas biológicos.

La invención también se refiere a la utilización de pentamidina para inhibir la acción de la endo-exonucleasa para inhibir la proliferación de células cancerígenas y el crecimiento de tumores. Uno también podría utilizar este compuesto para inhibir el crecimiento de tumores en solitario en combinación con fármacos conocidos que provocan roturas del ADN. Los agentes que inducen la roturas del ADN que están dentro del alcance de la presente invención incluyen cisplatino, mitomicina C, adriamicina, etopósido e irradiación de ionización.

ES 2 327 313 T3

Las composiciones o mezclas de estos compuestos y otros agentes se pueden administrar a pacientes que incluyen humanos y animales. Las composiciones incluyen todas las formulaciones farmacéuticas de un compuesto y un compuesto en su estado puro. Las combinaciones incluyen dos o más composiciones. Esto incluye dos o más formulaciones diferentes de un compuesto tal como una formulación de tableta y una formulación líquida. Las mezclas de dos o más compuestos en la misma formulación también están incluidas en el alcance de la invención. Las composiciones también incluyen excipientes tales como micelas, vesículas y liposomas, que mejoran el rendimiento terapéutico del compuesto y otros agentes. La acción de las vesículas, micelas y liposomas incluye la mejora de la solubilización de los compuestos y agentes, mejorando su suministro a las células tumorales, e interactuando con las células tumorales para hacer estas células más permeables a los compuestos agentes. La mejora de la eficiencia podría mejorar el tratamiento o permitir resultados equivalentes con una dosificación reducida y efectos secundarios reducidos.

Ejemplos

Las líneas celulares para adenocarcinoma de colon humano (HT29), adenocarcinoma de mama humano (MCF7) y carcinoma epitelioide humano (HeLa) se pidieron a partir del American Type Culture Collection (ATCC) y tienen los números de acceso ATCC HTB-38, HTB-22, y CCL-2 respectivamente. La célula primaria normal, NHDF, se obtuvo a partir del Dr. Shirley Lehnert. Estas células son fibroblastos de piel humana normal. Estas células crecieron en medio RPMI suplementado con 10% FCS a 37°C en una incubadora humidificada con 5% CO₂.

20 Ejemplo 1

Determinación de los niveles endo-exonucleasa en las células

El nivel de endo-exonucleasa en las líneas celulares se determinó con el procedimiento Immunoblot tal como se describe por parte de Chow y Resnick (1987). Las células que crecían de manera exponencial se hirvieron en tampón de lisis (0,125 M Tris-HCl pH 7,0, 20% glicerol, 4% SDS, 0,5 mM EDTA). Las células lisadas se centrifugaron a continuación a 10.000 g durante 10 minutos y 25 µl del supernatante se electroforisaron en un gel de SDS-poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) según el procedimiento descrito por parte de Laemmli (1970). Las proteínas que se separaron del gel SDS-PAGE se transfirieron de manera electroforética a una membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa se hizo reaccionar a continuación con antisero de conejo crecido contra la endo-exonucleasa CV-1 de mono en tampón B (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) que contenía un 0,5% de polvo de leche desnata da según el procedimiento previamente descrito de Chow y Resnick (1988). Después de que la membrana fuera alabada tres veces en el tampón B durante 15 minutos, la proteína A (un polipéptido aislado del *staphylococcus aureus* que se une a la región Fc que las moléculas de inmunoglobulina si interactúa en el sitio de unión del antígeno) se conjugó con peroxidasa de rábano en tampón B que contenía un 0,5% de polvo de leche desnata da se añadió a la membrana y se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó posteriormente con tampón B durante 15 minutos. Las señales positivas se indicaron mediante el desarrollo de color del substrato de 4-cloro-1-naftol en la correspondiente posición de la proteína en la reacción enzimática de la peroxidasa de rábano. Las cantidades relativas de señales positivas se detectaron utilizando un escáner HP4c y el programa de software Light Tool Research software.

40 Basado en este procedimiento, se calcularon los niveles de endo-exonucleasa en las células normales y en las líneas celulares HT29, MCF-7 y HeLa. Los resultados presentados en la figura 1 muestra que el nivel de la endo-exonucleasa es mucho mayor en células cancerígenas que en células normales. Los resultados sugieren que la inhibición de la enzima proporcionaría medios para atacar preferentemente las células cancerosas. Además, los resultados sugieren que la medición de las concentraciones de la enzima en fluidos o tejidos corporales proporciona unos medios de detección del cáncer y de monitorización de su progreso.

Ejemplo 2

50 *Determinación de la supervivencia celular*

La supervivencia celular se determinó según los siguientes procedimientos:

Supervivencia celular - Ensayo clonogénico: Se utilizó una medición clonogénica de la supervivencia celular para determinar la efectividad inicial de la pentamidina según el procedimiento descrito en Sadekova *et al.* (1997). En este procedimiento, se cultivaron células de fase de manera logarítmica (intervalo de 1000 a 3000 células/50 mm dependiendo del eficiencia de la preparación en placas) sobre placas de cultivo celular junto con varias concentraciones de fármacos (que varían entre 0,2 µM a 20 mM). Después de una semana de crecimiento, las colonias celulares y vinieron con violeta cristal y se contaron los números de colonias.

60 Supervivencia celular - Ensayo MTT: El procedimiento MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromuro) de determinación del crecimiento celular/citotoxicidad ofrece una alternativa conveniente para determinar la supervivencia celular. El MTT es una sal de tetrazolio que se prende mediante dehidrogenasas mitocondriales de células vivas. El desprendimiento convierte el MTT soluble en agua amarillo en un cristal de formazán púrpura insoluble. Los cristales se pueden solubilizar con una solución de 50% N,N-dimetilformamida (vol/vol), 20% SDS (peso/vol) (pH 4,7), y la absorbancia se determinó en una longitud de onda de 570 nm. Las células muertas no se desprendieron del MTT y el MTT no es detectable en esta longitud de onda. La cantidad de MTT que se desprende aumenta al aumentar el número de células, y disminuye como resultado de la citotoxicidad celular (Niks y Otto 1990, Hussain *et al.* 1993).

ES 2 327 313 T3

Las células se cultivaron a partir de cultivos celulares utilizando el protocolo estándar (Tripsina/EDTA). Las células (1000 a 5000 células dependiendo del tipo de célula en 50 μ l) se colocaron a continuación en placas y se incubaron durante una noche a 37°C antes de la adición de los reagentes experimentales (es decir, el fármaco de interés), para el experimento de combinación, ambos fármacos se añadieron. Después de dos días de incubación a 37°C, se añadieron a continuación 10 μ l de una solución de 5 mg/ml de MTT a todos los pozos experimentales, así como al pozo de control del medio. Las placas se incubaron además durante cuatro horas. Se añadió un tampón de solubilización de 100 μ l de MTT y las placas se incubaron durante una noche a 37°C. Las placas se leyeron a continuación sobre el lector de placas ELISA con una absorbancia a 570 nm y una referencia a 630 nm.

Línea celular de carcinoma de pulmón de Lewis y Cultivo Celular: El clon del carcinoma de pulmón de Lewis, M47, es un modelo metastásico. Las células del carcinoma de pulmón de Lewis se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal y penicilina-estreptomicina. Para la inducción del tumor, se lavaron las células tres veces con una solución de tampón de fosfato. Con continuación se volvieron a suspender en una disolución de 1x10⁶ células/0,1 ml. Solamente se utilizaron las células donde la viabilidad era mayor del 95% para estudios *en vivo*.

La cadena de razón utilizada en este estudio fue C57BL/10. Después de una semana de aclimatación, las células se trasplantaron en los ratones de manera subcutánea, como una suspensión de células tumorales. Todos los animales se inocularon en el mismo sitio.

Para medir el efecto de los fármacos sobre el tumor primario, las soluciones de fármacos se administraron mediante inyección intraperitoneal (ip) cada dos días. Los animales se sometieron, sobre una base diaria, a examen general. Se monitorizó el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo. Para determinar el efecto de los fármacos sobre la metástasis tumoral, los tumores se dejaron crecer hasta alcanzar un tamaño de 0,5-1,0 cm³. Los ratones se separaron de manera aleatoria en varios grupos y se proporcionaron los fármacos mediante ip. Al final de cada experimento, los animales se sacrificaron y se les practicó una autopsia. Los tumores, órganos o ambos se retiraron bajo condiciones estériles. Los tumores se pesaron. Los órganos se examinaron para cambios patológicos importantes y a continuación se colocaron en formalina. Los pulmones se colocaron en fijador de Bouin y las metástasis superficiales del pulmón se contaron utilizando un estereomicroscopio.

Línea celular RIF (Fibrosarcoma inducido por Radiación) y Cultivo Celular: El clon de fibrosarcoma inducido por radiación, RIF-1, es un modelo de tumor sólido. Las células de RIF-1 se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal y penicilina-estreptomicina. Para la inducción del tumor, se inyectaron 2 x 10⁵ células s.c. en las espaldas de los ratones desde la cadena C3H. Los tumores aparecieron en 10 días y alcanzaron un volumen de 94-130 mm³ en tres semanas. Se prepararon implantes de polímero de poli (ácido carboxifenoxipropano-co-sebálico) o poli (CPP-SA) que contenían el fármaco y se implantaron en el tumor según el procedimiento descrito por parte de Yapp *et al.* (1997). La misma persona midió los tamaños de los tumores cada dos días hasta que alcanzó cuatro veces el volumen inicial en el momento del implante. El volumen final fue de 400 mm³.

Para el experimento de combinación, se suministró una dosis de señal de irradiación gamma (⁶⁰Co, Theratron 780) con un índice de dosificación de 1 Gy/min 24 horas después del implante del polímero que contenía el fármaco.

Ejemplo 3

Aislamiento y ensayo de la endo-exonucleasa

La endo-exonucleasa humana es lo según el procedimiento descrito por parte de Liu y *et al* (1995). Las células cultivadas se separaron con tripsina-EDTA y las suspensiones celulares se centrifugaron a 4°C con una fuerza de 700 g durante 10 minutos. Las cuentas celulares se lavaron dos veces con salino tamponado con fosfato frío (PBS). Las células se volvieron a suspender a continuación y se sonicaron en 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, que contenía 5 mM EDTA y 1 mM PMSF (tampón A). Las suspensiones de lisis celular resultante se centrifugaron a 4°C a 10.000 g durante 15 minutos. Los supernatantes se cargaron a continuación sobre una columna definida de anticuerpo-proteína A-Sefarosa, tal como se describió previamente por parte de Chow y Resnick (1987). Después de lavarse de manera extensiva con tampón A, (es decir, hasta que el A₂₈₀ de los eluatos era cero), la columna se eluyó a continuación con tampón A que contenía 3,5 M MgCl₂ para eludir la endo-exonucleasa. La endo-exonucleasa eluída se dializó de manera extensiva contra el tampón A por lo menos 2 cambios de tampón y un cambio de agua destilada. La endo-exonucleasa se concentró a continuación mediante liofilización.

Las actividades de la nucleasa se determinaron midiendo la liberación de radiactividad soluble ácida del ADN pBR322 de cadena simple desnaturalizado con calor y marcado con γ -³²P según el procedimiento descrito por parte de Chow y Resnick (1983). Una única de actividad se definió como la cantidad de deoxiribonucleasa que obtiene 1 μ g de ADN soluble en ácido en 30 min a 37°C. Para el ensayo de inhibición con los fármacos, los fármacos añadieron a la endo-exonucleasa antes del inicio de la reacción de la nucleasa. La tabla 1 muestra los niveles de la inhibición de la endo-exonucleasa mediante varios agentes de quimioterapia.

ES 2 327 313 T3

TABLA 1

Inhibición de la actividad de la endo-exonucleasa mediante agentes de quimioterapia

Agentes de quimioterapia	Porcentaje de inhibición
Pentamidina (25 μ M)	37%
Pentamidina (50 μ M)	50%
Pentamidina (100 μ M)	100%
Distamicina A (38 μ M)	30%
Berenil (2mM)	17%
Mitomicina C (50 μ M)	0%
Etopósido (VP-16) (50 μ M)	0%

Ejemplo 4

Supervivencia celular en presencia de pentamidina utilizando ensayo clonogénico

La medición clonogénica de supervivencia celular se utilizó para determinar la efectividad inicial de la pentamidina según el procedimiento descrito anteriormente.

Los índices de supervivencia en presencia de pentamidina de las células primarias, y las células MCF7 y HeLa utilizando el ensayo clonogénico se muestran en la figura 2. Los resultados mostrados en la figura 2 se muestran que la pentamidina preferentemente ataca las células cancerígenas de una manera que depende de la dosis. Las líneas celulares MCF7 y HeLa cancerosas se compararon con las células de fibroblastos primarias humanas. Los índices de supervivencia de las células se midieron en diferentes dosis de pentamidina. La pentamidina empezó a matar las células cancerígenas en concentraciones de 0,1 mM y fue letal a una concentración de 10 mM. Bajo estas condiciones, la pentamidina no tuvo ningún efecto sobre las células humanas primarias normales. La dependencia de la dosis y la selectividad hacia las células cancerígenas muestran que la pentamidina es un útil agente contra el cáncer.

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 327 313 T3

Ejemplo 5

Actividad contra el cáncer

5 Las actividades contra el cáncer de la pentamidina y una serie de agentes contratantes conocidos se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

Comparación del LC₅₀ de varios agentes contratantes en las líneas celulares cancerígenas

15 20 25 30 35 40	Tipo de célula cancerígena	Pentamidina (mM)		Mitomicina C (mM)		Etopósido (mM)		Cisplatino (mM)	
		2 días	4 días	2 días	4 días	2 días	4 días	2 días	4 días
	H520	0,24	0,13	0,234	0,130	>34	>34	0.50 ³	-
	H460	1,34	0,16	0,065	0,030	>34	>34	0.50 ³	-
	H661	0,15	0,07	0,006	0,008	28	15,6	0.41 ³	-
	MCF-7	0,15	0,08	0,034	0,013	1	1,1	0.49 ³	-
				0,024 ³		1 ³			
	HT29	0,27	0,06	0,008	0,008	0,7	0,4	0.48 ³	-
				0,024 ³		0,7 ³			

45 En la tabla 2, los tipos de células cancerígenas son: H520 - NSCLC (carcinoma escamoso, tumor primario), H460 - NSCLC (gran carcinoma celular, efusión pleural), H661 - NSCLC (gran carcinoma celular, nodo linfático), MCF-7 - cáncer de mama (Adenocarcinoma, efusión pleural), HT29 - cáncer de colon (Adenocarcinoma, tumor primario). El periodo de tiempo en el que las células están expuestas al compuesto se indica en términos de días. Los datos indicados mediante el número 3 se obtuvieron del National Cancer Institute.

50 55 LC₅₀ es la concentración de un fármaco o producto químico que marca el 50% de las células. Los resultados muestran que la pentamidina es un agente contra el cáncer. Nosotros también muestran que la pentamidina es más letal con las células que el etopósido, pero menos que la mitomicina C. La efectividad de la pentamidina aumenta si el experimento se realiza a lo largo de cuatro días, opuesto a dos. Esto sugiere que las roturas de cadenas que se producen de manera natural en el ADN son relativamente infrecuentes y que una exposición prolongada a la pentamidina es beneficiosa.

60 El uso clínico de estos agentes depende del equilibrio entre la actividad contra el cáncer y los efectos secundarios dañinos. Así, un agente relativamente no tóxico, que se puede dar en una alta concentración puede ser más efectivo que un agente más agresivo pero tóxico, que solamente se puede tolerar en dosis muy pequeñas. Basado en los datos clínicos conocidos, la pentamidina tiene una baja toxicidad.

ES 2 327 313 T3

Las actividades contra el cáncer de la pentamidina y la distamicina A y el berenil se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

5 *Comparación del LC₅₀ de la Pentamidina, Distamicina A, y Berenil sobre líneas celulares cancerígenas*

10	Tipo de célula cancerígena	Pentamidina (mM)	Distamicina A (mM)	Berenil (mM)
15		2 días	2 días	2 días
H520	0,24	>2,0	>4,0	
H460	1,34	>2,0	>4,0	
20	H661	0,15	>2,0	>4,0
MCF-7	0,15	1.52	3,0	
25	HT29	0,27	>2,0	>4,0

30 Los tipos de células cancerígenas son: H520 - NSCLC (carcinoma escamoso, tumor primario), H460 - NSCLC (gran carcinoma celular, efusión pleural), H661 - NSCLC (gran carcinoma celular, nodo linfático), MCF-7 - cáncer de mama (Adenocarcinoma, efusión pleural), HT29 - cáncer de colon (Adenocarcinoma, tumor primario).

El periodo de tiempo en días en los que las células están expuestas al compuesto se indica en la tabla 3.

35 Estos resultados muestran que estos inhibidores de endo-exonucleasa tienen actividad contra el cáncer.

Ejemplo 6

Combinación de inhibidores de endo-exonucleasa con inductores de rotura del ADN

40 Los datos en la tabla 4 muestran el efecto de combinar pentamidina con mitomicina C, etopósido y cisplatino.

TABLA 4

45 *LC₅₀ de la pentamidina sobre células cancerígenas cuando se utiliza en solitario o en combinación con otros agentes contra el cáncer*

50	Tipo de célula cancerígena	Pentamidina (mM) 2 días	Pentamidina (mM) con Mitomicina C (1,56 µM) 2 días	Pentamidina (mM) con Etopósido (34 µM) 2 días	Pentamidina (mM) con Cisplatino (0,025 µM) 2 días
55	H661	0,15	0,0029	0,10	0,039
60	MCF-7	0,15	0,0029	0,049	0,082
65	HT29	0,27	0,0022	0,085	0,032
El periodo de tiempo de exposición a la mezcla se indica en días.					

ES 2 327 313 T3

La comparación de los datos en las tablas 2 y 4 muestra que la utilización de pentamidina en combinación con mitomicina reduce las concentraciones de estos fármacos necesarios para conseguir la muerte celular. Lo mismo se aplica a la pentamidina y al etopósido. La magnitud del efecto sugiere que la utilización de pentamidina en combinación con mitomicina y etopósido provoca una destrucción muy eficiente de las células cancerígenas. Esto permite el suministro de dosis mucho menos tóxicas que fármacos contra el cáncer, tales como la mitomicina y el etopósido.

La figura 3 muestra que la combinación de mitomicina y etopósido con pentamidina es de 50 a más de 1000 veces más eficiente para matar células cancerígenas que la utilización de mitomicina C y etopósido en solitario.

Hemos definido la eficiencia de la combinación como sigue:

$$\text{Eficiencia} = ([\text{Pentamidina}]_0 / [\text{Pentamidina}]_c) * ([P]_0 / [P]_c)$$

En esta ecuación $[\text{Pentamidina}]_0$ es la dosis LC_{50} de pentamidina cuando se utiliza en solitario mientras que $[\text{Pentamidina}]_c$ es la dosis LC_{50} requerida en el experimento de combinación. “P” representa Mitomicina o Etopósido y los subíndices “0” y “c” se refieren respectivamente al experimento cuando los materiales se utilizaron en solitario y en el experimento de combinación.

La figura 4 muestra que combinando cisplatino y pentamidina se produce un aumento incluso más profundo en la eficiencia para matar las células cancerígenas. La combinación de cisplatino con pentamidina es de hasta 16.000 veces más eficiente que la utilización de cisplatino en solitario. Este aumento sorprendente es consistente con los mecanismos conocidos de acción de los agentes de quimioterapia. La mitomicina C y el etopósido consiguen la muerte celular a través de un mecanismo complejo que implica roturas de cadena simple. Relativamente pocas de estas roturas de cadena simple progresan a roturas de cadena doble. Por el contrario, el cisplatino opera mediante mecanismos que finalmente induce las roturas de cadena doble. La endo-exonucleasa repara las roturas de cadena doble. Estos resultados demuestran que el cultivo celular, la inhibición de la endo-exonucleasa con pentamidina aumenta la eficiencia de la actividad contra el cáncer de los agentes que inducen las roturas de cadena doble mucho más que los agentes que inducen las roturas de cadena simple.

La adición de pentamidina a un tratamiento de quimioterapia permite reducir las concentraciones de agentes de quimioterapia sin ninguna pérdida de eficiencia. También mejora la eficiencia del tratamiento.

Ejemplo 7

Experimentos animales

La figura 5 muestra los resultados de un experimento preliminar donde ratones con tumores de fibroblasto (RIF) bastante grandes (100 mm^3) (una línea celular derivada del cáncer de piel) recibieron implantes tumorales con un polímero biodegradable que contiene una gente contra el cáncer estándar salino, de pentamidina o 5-fluorouracil. La pentamidina tuvo una eficacia intermedia en la ralentización del crecimiento del tumor entre el control salino y el 5-fluorouracil. El resultado es positivo porque los tumores sólidos ya estaban bien establecidos y las dosis de pentamidina nos habían optimizado.

El sistema de implantes de polímero es una manera conveniente de administrar el fármaco de interés. La biodegradación del polímero provoca que el fármaco se libere. Sin embargo, la degradación es completar después de tres o cuatro días, después de lo cual ya no está disponible más fármaco. A pesar de estas limitaciones, la pentamidina ha mostrado que es efectiva en el periodo cuando el fármaco estuvo disponible.

La figura 6 muestra los resultados de un experimento similar utilizando un implante de polímero para suministrar pentamidina. El experimento se realizó en razones con tumores de fibroblasto (RIF) que también fueron tratados con radiación (24 horas después del implante) poco después de que los tumores hubieran alcanzado un tamaño de 100 mm^3 . Los resultados en la figura 6 muestran que los efectos beneficiosos del tratamiento de radiación han finalizado el día 12 después del tratamiento. Sin embargo, los animales tratados con la combinación de radiación y pentamidina no tuvieron ningún crecimiento significativo del tumor durante un período mucho más largo. La pentamidina se suministró a través de un implante de polímero y, por lo tanto, fue consumido después de tres o cuatro días. Sin embargo, los efectos beneficiosos de su acción fueron bastante persistentes. Los ratones de prueba no mostraron señales obvias de ningún efecto secundario debido al uso de la pentamidina.

La figura 7 muestra la efectividad de la pentamidina como una gente contra el cáncer cuando se utiliza contra el modelo del tumor primario de carcinoma de pulmón de Lewis. La pentamidina se suministró mediante inyección diaria. Los resultados muestran que la pentamidina era tan efectiva en la inhibición del crecimiento del cáncer como el cisplatino, un compuesto que actualmente se utiliza para el tratamiento de cáncer de pulmón.

Los implantes de tumores de pulmón en el carcinoma de pulmón de Lewis forman tumores secundarios mediante metástasis. El efecto de la pentamidina sobre la incidencia de estas metástasis de pulmón se estudió en un estudio separado. En los exámenes *post-mortem*, se contaron las metástasis de pulmón de los ratones. La pentamidina redujo

ES 2 327 313 T3

la metástasis de una manera que depende de la dosis mediante un factor de tres con la dosis probada más alta. Los resultados de estos exámenes *post-mortem* se indican en la tabla 5.

TABLA 5

5 *Efecto de la pentamidina sobre las metástasis de pulmón en el modelo de ratón de carcinoma de pulmón de Lewis*

Compuesto	Número de metástasis/pulmón
Modelo	34±3
Pentamidina (25 mg/kg)	23±3
Pentamidina (50 mg/kg)	10±2

10 20 Ejemplo 8

Experimentos con animales en vivo

15 25 *Materiales y procedimientos*

30 Se suministró pentamidina. La solución se realizó mediante la disolución de pentamidina en agua destilada estéril. La solución de pentamidina fue dividida en alícuotas y se almacenan a -20°C bajo recepción. Inmediatamente antes del uso, el stock de fármaco se descongeló rápidamente, se mantuvo a 4°C y se protegió contra la luz hasta la administración. Se proporcionaron cisplatino y adriamicina. Estos fármacos se prepararon como se indicó para la preparación clínica. La solución salina (0,9%) de cloruro de sodio se almacenó a 4°C.

Línea celular del carcinoma de pulmón de Lewis y cultivo celular

35 40 Se utilizó el clon del carcinoma de pulmón de Lewis, M47, con un alto potencial metastásico en el pulmón. Los tumores inducidos por el M47 se han caracterizado bien en relación con sus índices de crecimiento y respuesta a los fármacos de quimioterapia estándar. La célula utilizada se confirmó que estaba libre de micoplasma. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% bajo 5% CO₂. A continuación las células se propagaron y los stocks de los mismos pasos establecieron emocionaron el nitrógeno líquido. Se realizaron estudios de oncoenzimas con el mismo stock de células y el mismo número de pasos.

45 Para la inducción del tumor, las células crecieron a una confluencia del 70% del medio completo y a continuación se recogieron utilizando solución de tripsina-EDTA [0,05% tripsina 0,53 mM EDTA-4Na en H_BSS sin Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, y NaHCO₃; Cellgro no. 25-052-Li]. Las células se centrifugaron a continuación y se lavaron tres veces con solución de tampón de fosfato [D-PBS, Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ free; Cellgro no. 21-031-LV], y se volvieron a suspender en una disolución de 0,1 a 1x10⁶ células/0,1 ml. Se examinó la viabilidad mediante teñido azul de tripán y solamente se utilizaron células en las cuales la viabilidad era mayor del 95% para los estudios *en vivo*.

50 55 *Inoculación de células tumorales y tratamiento*

La cadena de ratón utilizaba en este estudio es C57BL/10 de Charles River Inc. los animales se guardaron cinco por caja y se alimentaron con una dieta de pienso animal y agua *ad libitum*. Después de una semana de aclimatación, se trasplantaron células LLC de manera subcutánea, como una suspensión de células tumorales [2-5x10⁵ células viables por 0,1 ml], en la región axilar del flanco derecho. Todos los animales fueron inoculados en el mismo sitio. Los animales se sometieron, sobre una base diaria, a examen general. El crecimiento de los tumores se monitorizó cada segundo o tercer día utilizando calibres. Los parámetros medidos fueron: tumor medido a lo largo del eje más largo (longitud) y eje perpendicular más corto (anchura) y el volumen relativo del tumor (en cm³) se calculó mediante la fórmula: [longitud (cm) x (anchura cm)²] (aproximadamente 10-15 días), los ratones se seleccionaron de manera aleatoria en uno de los siguientes grupos:

60 65 1) *Metástasis*

Los animales se sometieron a cirugía para retirar el tumor primario. Los ratones se anestesiaron ligeramente con Forane. La piel por encima del tumor se lavó con betadine y etanoles, en una tolva de flujo laminar. Se realizó una pequeña incisión en la piel (0,5-1 cm) utilizando un escalpelo estéril, del tumor se separó cuidadosamente de los tejidos normales (piel y músculo). Las células de carcinoma de pulmón de Lewis (en una etapa temprana de crecimiento; 1-3 semanas) son un tumor bien localizado la separación fue fácil de conseguir sin ningún daño significativo a los tejidos

ES 2 327 313 T3

normales. El tumor se retiró, se casó en algunos casos se fijó para propósitos de histopatología. En seguida se cerró con clips de acero inoxidable quirúrgicos (Autoclips; 9 mm; Clay Adams, Inc. Parsippany, NJ). Este lugar también se desinfectó con betadine y el animal se guardó tal como se ha descrito anteriormente.

5 En este grupo, los ratones se separaron de manera aleatoria después de la cirugía en un grupo de cinco por jaula. Las jaulas se asignaron de manera aleatoria a grupos experimentales específicos. Los ratones se marcaron a continuación mediante números utilizando el procedimiento de “punción en la oreja”. Los ratones fueron comprobados sobre la base diaria para asegurar la ausencia de infección. Los animales con malestares se sacrificaron inmediatamente. Para
10 cada experimento, se incluyó un grupo separado extra adicional de control para determinar el momento óptimo para el sacrificio para obtener un número significativo de metástasis de pulmón bien localizados. Este grupo al mismo procedimiento experimental que el grupo 1 con excepción del tratamiento con fármacos. Basado en este grupo, se encontró que un periodo de aproximadamente dos semanas después de la retirada del tumor primario resultó en un promedio de 25-35 nódulos.

15 2) *Tumor primario*

Las condiciones para este grupo fueron idénticas al grupo utilizado para los experimentos sobre metástasis con excepción de que el tumor primario no se retiró, los animales se mantuvieron hasta que los tumores alcanzaron gran tamaño que justificaba el sacrificio del animal, o los animales manifestaron un malestar que justificó su sacrificio
20 (movilidad reducida, síntomas respiratorios severos, etc.).

3) *Planificación de clasificación y tratamiento*

La pentamidina y los fármacos de quimioterapia se suministraron como se describe en los resultados. A los animales de control se les proporcionó el mismo volumen de solución salina [0,9% de cloruro de sodio]. La dosis de cada fármaco se normalizó al peso corporal por animal.

La pentamidina y el cisplatino se indicaron mediante inyecciones intraperitoneales. La adriamicina señorito de manera intravenosa. La pentamidina y los fármacos de quimioterapia también se suministraron a los animales en momentos diferentes. Se les proporciona cada segundo día para un total de cinco veces. También es posible indicar la pentamidina y todos los fármacos de quimioterapia de manera intravenosa y al mismo tiempo. Este procedimiento de régimen de administración o de provocar una eficiencia de combinación diferente.

35 *Sacrificio del animal, preparación del tumor/órgano*

Al final de cada experimento (un total de 5-8 semanas), los animales se sacrificaron mediante dislocación y se les realizó la autopsia. Los tumores, órganos o ambos se retiraron bajo condiciones estériles (utilizando una tolva de flujo laminar). Los tumores se pesaron. Los órganos (5 por grupo) se examinaron para grandes cambios patológicos de continuación se colocaron en formalina a 10%. Los pulmones se colocaron en fijador de Bouin al 10% en una solución de formalina, se contaron las metástasis de la superficie del pulmón utilizando un estereomicroscopio con una magnificación de 4x o un vidrio de magnificación, y en algunos casos los pulmones se incrustaron en cera de parafina según los procedimientos estándar. Los tejidos incrustados se utilizaron para confirmar las metástasis y también examinar los cambios histopatológicos.

45 *Análisis de sangre*

Para algunos experimentos que implican combinaciones de fármacos, se extrajo sangre de 3-5 animales por grupo mediante punción cardíaca. La sangre se recogió en tubos con heparina y se analizó.

50 *Ánalisis estadístico*

La prueba T Student de dos vías se utilizó para comparar la significancia estadística entre varios grupos.

Resultados

55 *Toxicidad de la Pentamidina*

Se realizó un estudio preliminar ratones que no tenían tumores para examinar la dosis máxima tolerable de pentamidina se puede utilizar para los estudios contra los tumores. Se probaron tres inyecciones intraperitoneales (día 60 1, día 3 y día 5) de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg de peso corporal respectivamente. Todos los animales que recibieron 100 mg/Kg de peso corporal murieron debido a la aguda toxicidad tal como se muestra en la figura 8. Esto se observó incluso después de utilizar inyección IP. Las dosis de 25 y 50 mg/Kg de peso corporal fueron toleradas sin ningún efecto secundario aparente. Por lo tanto, las dosis menores o iguales a 50 mg/Kg se utilizaron para examinar la actividad biológica de la pentamidina.

ES 2 327 313 T3

Efecto de la pentamidina sobre crecimiento de tumores primarios

Se utilizaron varios experimentos independientes para examinar las propiedades contra los tumores de la pentamidina sobre crecimiento del tumor primario LLC. Estos experimentos indican que la dosis más activa es de 50 mg/Kg ($p < 0,01$), tal como se muestra las figuras 10 a 15. El efecto contra el tumor de la pentamidina fue muy claro el último día del crecimiento del tumor (día 14-16), tal como se muestra en la figura 10. Indicar que la pentamidina fue tan activa como el cisplatino con una dosis de 3-4 mg/Kg/ip (Figura 13). Además, en un experimento mostrado en las figuras 14a y 14b, es importante indicar que si la pentamidina se combinaba con 3 mg/Kg de cisplatino, algunos animales mostraron una regresión completa de los tumores. Sin embargo, estos animales no se mantuvieron durante un periodo de tiempo más largo para asegurar el tumor no volvía a crecer. Combinaciones de 50 mg/Kg de pentamidina y adriamicina mostraron algún efecto beneficioso (figura 18) pero como la adriamicina es muy tóxica en la dosis más alta probada (7,5 mg/Kg/iv, 100% de mortalidad (figura 19)), mientras que la dosis mínima de 5 mg/Kg tiene un efecto potente contra el tumor como lo tenía la pentamidina, se pueden requerir dos es menores para un aumento adicional de la eficiencia de la combinación.

Efecto de la pentamidina en la formación de la metástasis

En el experimento preliminar, se observó que la pentamidina en una dosis de 50 mg/Kg inhibe la metástasis del pulmón en más del 50% en comparación con el control tratado con salino ($p < 0,001$), tal como se muestra en la figura 16. También se confirmó esto en experimentos posteriores. Una dosis de pentamidina de 50 mg/Kg encontró que era la más activa ($p < 0,01$), mientras que dosis de 10-25 mg/kg no tenían ningún efecto significativo. Microscópico mostró claramente que el número de nódulos metastásicos era claramente reducido en animales tratados con pentamidina y los tamaños de los nódulos eran menores, en comparación con el grupo tratado con salino. Una combinación de 50 mg/Kg/ip de pentamidina y 4 mg/kg/ip de cisplatino mostró un efecto mejorado tal como se muestra en la figura 17. De una manera similar, una combinación de 50 mg/Kg/ip de pentamidina y 5 mg/kg de adriamicina/iv mostró un efecto beneficioso, tal como se muestra en la figura 20.

Conclusiones

Este estudio indica que la pentamidina inhibe el crecimiento del tumor de carcinoma del pulmón de Lewis en dosis tolerables después de administración intraperitoneal crónica.

Se observó claramente un efecto contra la metástasis de una manera dependiente del efecto de la dosis en grupos donde el tumor primario se retiró después alcanzar un tamaño de 0,5 a 1 cm³. La máxima dosis tolerada de 50 mg/Kg fue la más activa. El examen macroscópico revela que los números de nódulos de pulmón se redujeron y, cuando estaban presentes, eran menores en los grupos tratados con pentamidina comparados con los controles.

La combinación de pentamidina y fármacos de quimioterapia mejora claramente la respuesta terapéutica a la vista de los datos obtenidos.

Composiciones farmacéuticas

Composiciones farmacéuticas de los compuestos anteriores se utilizan para el tratamiento de pacientes que tienen cáncer. Los vehículos para suministrar los compuestos de la presente invención a los tejidos objetivo a través del cuerpo humano incluyen salino y D5W (5% de dextrosa y agua). Los recipientes utilizados para la preparación de formas de dosificación oral de los compuestos de la presente invención incluyen aditivos tales como un tampón, solubilizador, agente de suspensión, agente de emulsión, agente de control de la viscosidad, aroma, relleno de lactosa, antioxidante, preservativo o tinte. Se prefieren esribientes para parenteral y otra administración. Estos esribientes incluyen albúmina de suero, ácido glutámico o aspártico, fosfolípidos y ácidos grasos.

La formulación preferida es en forma líquida almacenada en un vial o en una bolsa intravenosa. Los compuestos de la presente invención también se pueden formular en forma sólida o semisólida, por ejemplo píldoras, tabletas, cremas, ungüentos, polvos, emulsiones, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios, geles o membranas.

La ruta de administración preferida es intravenosa. Otras rutas aceptables y administración incluyen administración oral, tópica, rectal, parenteral (inyectable), local, de inhalación y epidural. Las composiciones de la invención también se pueden conjugar para transportar moléculas o incluirse en modalidades del transporte tales como vesículas y micelas para facilitar el transporte de las moléculas. Los procedimientos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a los pacientes son conocidos en la técnica.

Las composiciones de la invención también se pueden conjugar para transportar moléculas, anticuerpos monoclonales o transportar modalidades tales como vesículas y micelas que se dirigen preferentemente a las células cancerígenas o que potencian las células cancerígenas para recibir los fármacos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen los compuestos de la presente invención se pueden administrar humanos o animales. Las dosis que se administran dependen de la condición del paciente individual, la indicación del fármaco, la

estabilidad física y química del fármaco, la toxicidad, el efecto deseado y de la ruta elegida de administración (Robert Rakel, ed., Conn's Current Therapy (1995, W.B. Saunders Company, USA)). Estas composiciones farmacéuticas se utilizan para el tratamiento del cáncer.

5 Ejemplo 9

Procedimiento de diagnóstico

Materiales y procedimientos

10 Suero de pacientes de cáncer fue colocado en gotas sobre una membrana de nitocelulosa y fue sondado con anti-suero de conejo elevado contra la endo-exonucleasa según el procedimiento descrito por parte de Liu *et al* (1995). En este procedimiento, una muestra de la proteína de endo-exonucleasa se coloca en gotas sobre un substrato de membrana. Una solución de anticuerpos policlonales de conejo se añadieron a la membrana sobre la cual se han colocado en 15 gotas las muestras. Los anticuerpos se unen a la proteína. Después del lavado, una segunda solución de un anticuerpo de anti-conejo o una proteína A comercialmente disponible se añade con peroxidasa de rábano picante (hrp). Después del lavado, se añade finalmente la membrana 4-cloro-1-naftol. Éste reacciona con la hrp conjugada para producir 20 un color azul. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de endo-exonucleasa presente. En resumen, las proteínas del suelo se colocaron en gotas sobre la membrana utilizando el aparato de transferencia por ranuras Bio-Rad. La membrana se sumergió a continuación con 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 que contenía 1 mM EDTA. Después del lavado, la membrana si hubo un anticuerpo de anti-endo-exonucleasa en tampón B (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) que contenía un 1% del polvo de leche desnudada. Después de lavar la membrana tres veces en 25 tampón B durante 15 minutos, se añadió a la membrana anti-conejo-Igg conjugado con peroxidasa de rábano picante o proteína A conjugada con peroxidasa de rábano picante en tampón B que contenía un 1% del polvo de leche desnudada y se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó posteriormente con tampón B durante 15 minutos, conteniendo el tampón 1 M NaCl durante 30 minutos, y el tampón B otra vez durante 15 minutos. Después del lavado, se añadió a la membrana una solución de 4-cloro-1-naftol. La reacción con cualquier peroxidasa de rábano picante presente produjo un color azul.

30 III Resultados

Con las muestras de suero de 37 pacientes de cáncer (metástasis de cáncer de mama) de historia conocida, se encontró una correlación entre la supervivencia y el nivel de endo-exonucleasa. Con un punto de corte para una alta 35 endo-exonucleasa que se utilizó de 5,5, el grupo de pacientes que tenía una supervivencia promedio de 38,91 meses tenía un bajo nivel de endo-exonucleasa, mientras que el grupo que tenía una supervivencia promedio de 10,43 meses tenía altos niveles de endo-exonucleasa. El valor p de 0,02 indicó una alta significancia estadística para el resultado. Además, virtualmente todos los pacientes de cáncer fueron detectados con niveles anormales de endo-exonucleasa (por encima del valor detectado con individuos libres de cáncer), mientras que el marcador de diagnóstico de cáncer 40 estándar, CEA, solamente se probó positivo en el 25% de las muestras de suero de los pacientes.

IV Conclusiones

El estudio indicó que el nivel de endo-exonucleasa tiene una buena correlación con la longitud de la supervivencia 45 en pacientes con cáncer de mama metastásico.

Se detectó un nivel anormal de endo-exonucleasa en casi todos las muestras de los pacientes, mientras que el marcador diagnóstico del cáncer estándar, CEA, dio resultados positivos en solamente un 25% aproximadamente de las muestras de los mismos pacientes.

Aunque la invención se ha descrito con realizaciones preferidas, debe entenderse que se podrán realizar modificaciones a cómo serán evidentes para los expertos en la materia. Estas modificaciones y variaciones suelen considerar dentro del articulado y alcances de la presente invención.

Referencias

- 55 **Chow, T. Y-K., y Resnick, M. A. (1983)** The identification of a deoxyribonuclease controlled by the RAD52 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. In Friedberg, E. C. and Bridges, B. A. (eds), *Cellular Responses to DNA Damages*. Alan R. Liss, New York, pp. 447-455.
- 60 **Chow, T. Y-K., y Resnick, M. A. (1987)** Purification and characterization of an endo-exonuclease activity of yeast that requires a functional RAD52 gene. *J. Biol. Chem.*, 262, 17659-17667.
- 65 **Chow, T. Y-K., y Resnick, M. A. (1988)** An endo-exonuclease activity of yeast that requires a functional RAD52 gene. *Mol. Gen. Genet.* 211, 41-48.
- Hussain, R. F., Nouri, A. M. E., y Oliver, R. T. D. (1993)** A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods*. 160, 89-96.

- Liu, G., Lehnert, S., y Chow, T. Y.-K. (1995)** Mammalian endo-exonuclease activity and its level in various radiation sensitive cell lines. *Mutagenesis* 10, 91-94.
- Niks, M., y Otto, M. (1990)** Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods*. 130, 149-151.
- Pérez, J. M. et al., (1993)** Binding of Pt-pentamidine to nucleosomal DNA. Studies of the antiproliferative activity of the drug against human cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 89 64-72.
- Sadekova, S., Lehnert, S., y Chow, T. Y.-K. (1997)** Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in the induced radioresistance. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 653660.
- Tuan, I.-Z., et al., (1992)** *Pneumocystis carinii* pneumonitis following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 10: 268-272.
- Waalkes, T. P., et al., (1970)** Pentamidine: Clinical pharmacologic correlations in man and mice. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 11 (4) 505-512.
- Yapp, D. T-T., Lloyd, D. K., Zhu, J., y Lehnert, S.M. (1997)** Tumour treatment by sustained intratumoural release of cisplatin: effects of drug alone and combined with radiation. *Int. J. Rad. Oncol.* 39, 497-504.

Referencias citadas en la descripción

25 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 30 • US 5324830 A [0005]
• US 5489524 A [0005]
35 • US 5204352 A [0007]
• US 5084480 A [0007]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 40 • The identification of a deoxyribonuclease controlled by the RAD52 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **CHOW, T. Y.-K.; RESNICK, M. A.** *Cellular Responses to DNA Damages*. Alan R. Liss, 1993, 447-455 [0084]
- 45 • **CHOW, T. Y.-K.; RESNICK, M. A.** Purification and characterization of an endo-exonuclease activity of yeast that requires a functional RAD52 gene. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 17659-17667 [0084]
- 50 • **CHOW, T. Y.-K.; RESNICK, M. A.** An endo-exonuclease activity of yeast that requires a functional RAD52 gene. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, vol. 211, 41-48 [0084]
- 55 • **HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D.** A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods*, 1993, vol. 160, 89-96 [0084]
- 60 • **LIU, G.; LEHNERT, S.; CHOW, T. Y.-K.** Mammalian endo-exonuclease activity and its level in various radiation sensitive cell lines. *Mutagenesis*, 1995, vol. 10, 91-94 [0084]
- 65 • **NIKS, M.; OTTO, M.** Towards an optimized MTT assay. *J. Immunol. Methods*, 1990, vol. 130, 149-151 [0084]
- 60 • **PÉREZ, J. M. et al.** Binding of Pt-pentamidine to nucleosomal DNA. Studies of the antiproliferative activity of the drug against human cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 1993, vol. 89, 64-72 [0084]
- 65 • **SADEKOVA, S.; LEHNERT, S.; CHOW, T. Y.-K.** Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in the induced radioresistance. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1997, vol. 72, 653660 [0084]
- 65 • **TUAN, I.-Z. et al.** *Pneumocystis carinii* pneumonitis following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 1992, vol. 10, 268-272 [0084]

ES 2 327 313 T3

- **WAALKES, T. P.** et al. Pentamidine: Clinical pharmacologic correlations in man and mice. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1970, vol. 11 (4), 505-512 [0084]
- 5 • **YAPP, D. T- T; LLOYD, D. K.; ZHU, J.; LEHNERT, S.M.** Tumour treatment by sustained intratumoural release of cisplatin: effects of drug alone and combined with radiation. *Int. J. Rad. Oncol.*, 1997, vol. 39, 497-504 [0084]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica adecuada para inhibir la proliferación de células cancerígenas un crecimiento de tumores que comprende pentamidina y un agente que induce roturas en cadenas de ADN seleccionado entre el grupo que consiste en cisplatino, mitomicina C, adriamicina y etopósido.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que dicha pentamidina o dicho agente se conjuga a un agente de transporte para suministrarse a las células cancerígenas.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el agente de transporte se selecciona entre el grupo que consiste en micelas, vesículas, liposomas y anticuerpos monoclonales.
- 20 4. Utilización de pentamidina en combinación con un agente que induce roturas en cadenas de ADN seleccionado entre grupo que consiste en cisplatino, mitomicina C, adriamicina y etopósido para la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación de células cancerígenas o para inhibir el crecimiento de tumores en un paciente.
- 25 5. Utilización de pentamidina en la preparación de aditamentos para inhibir la proliferación de células cancerígenas o para inhibir el crecimiento de tumores en un paciente.
- 26 6. Utilización de un anticuerpo de endo-exonucleasa para la preparación de un agente para el diagnóstico de cáncer en un paciente.
- 27 7. Pentamidina para su uso en la inhibición de la proliferación de células cancerígenas con crecimiento de tumores en combinación con irradiación de ionización.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 327 313 T3

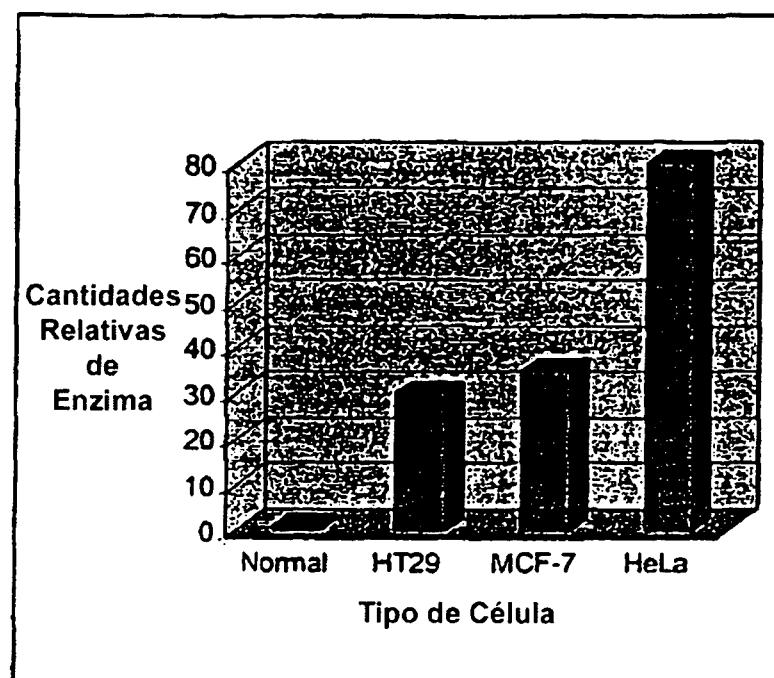


Figura 1

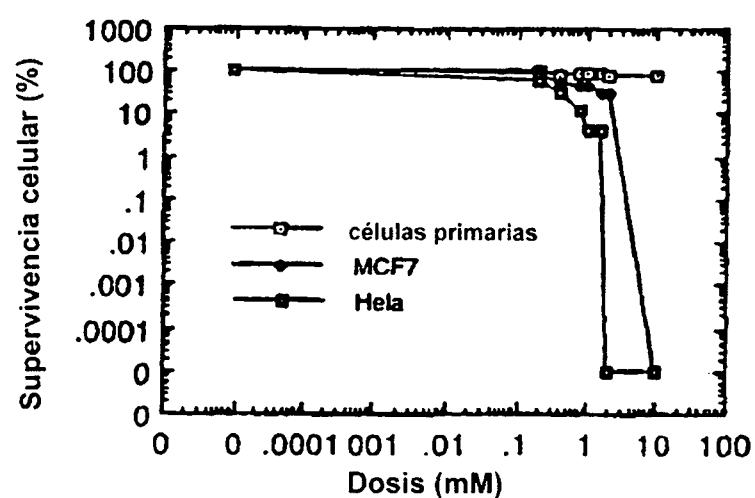


Figura 2

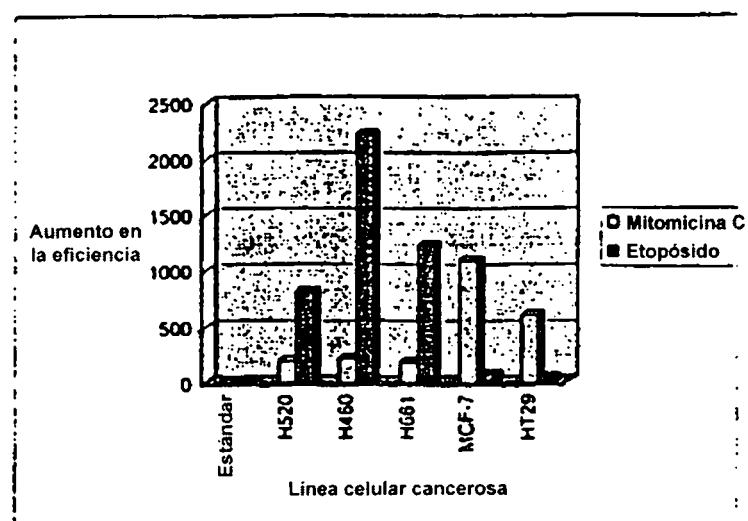


Figura 3

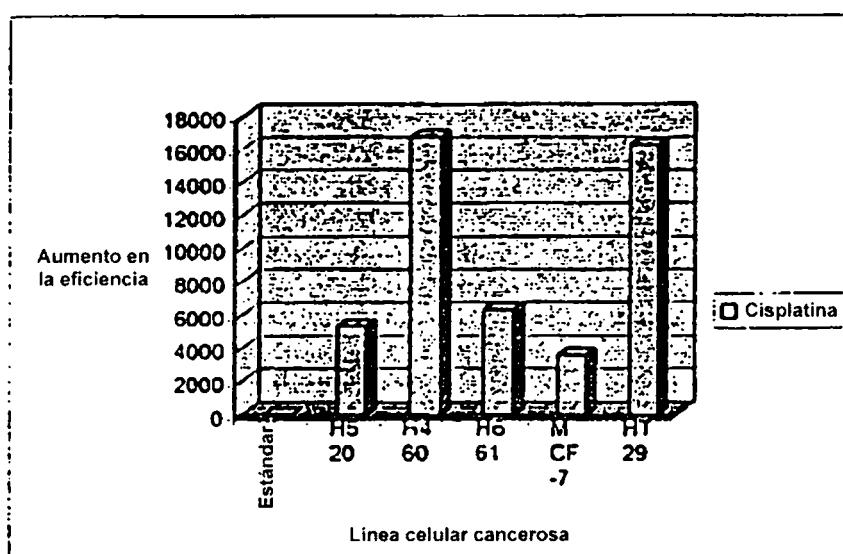


Figura 4

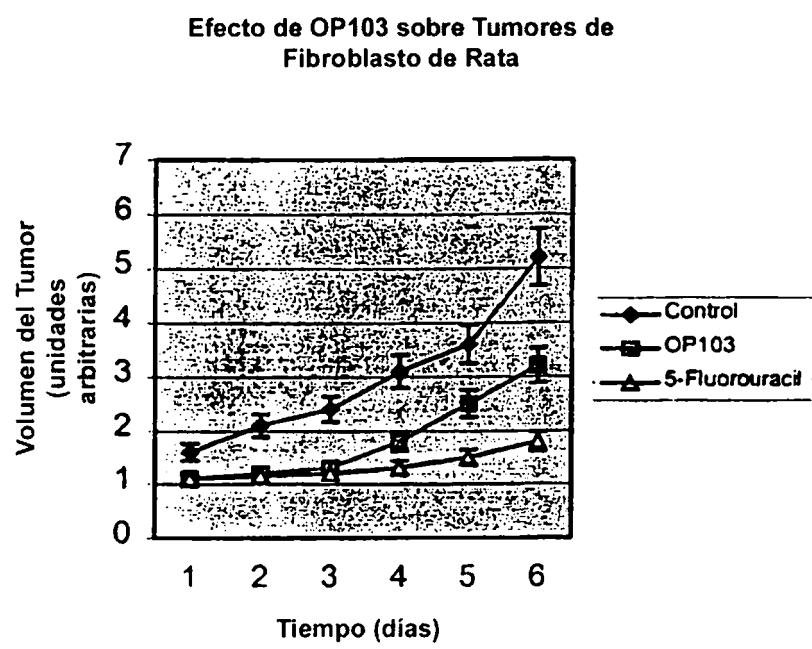


Figura 5

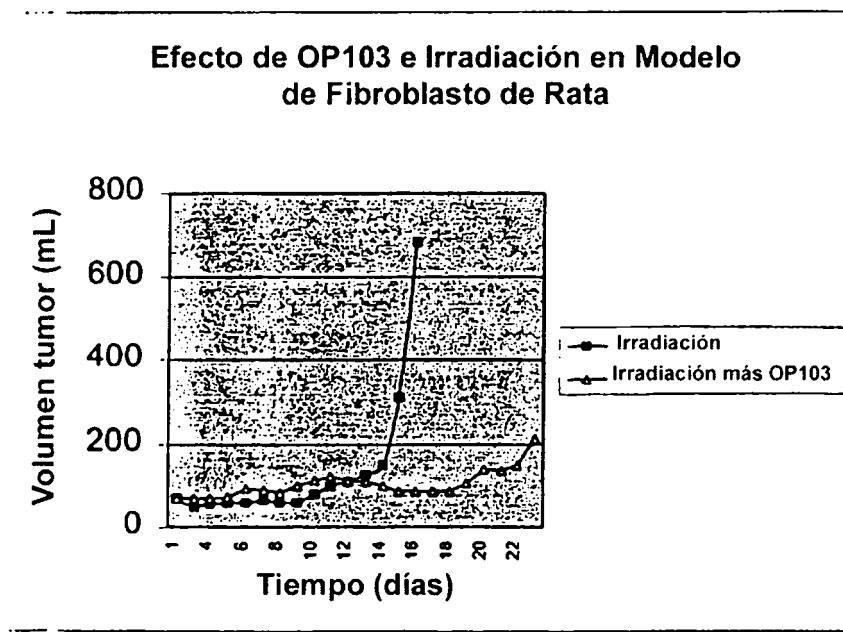


Figura 6

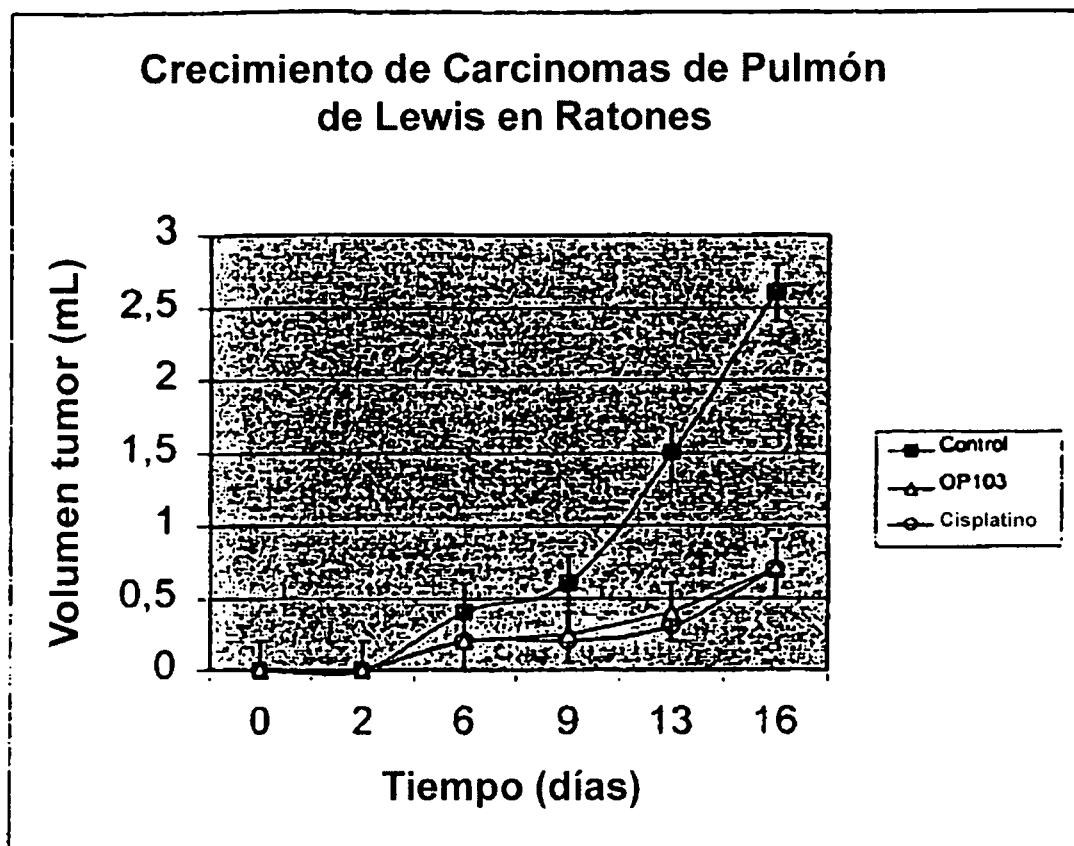


Figura 7

Figura 8

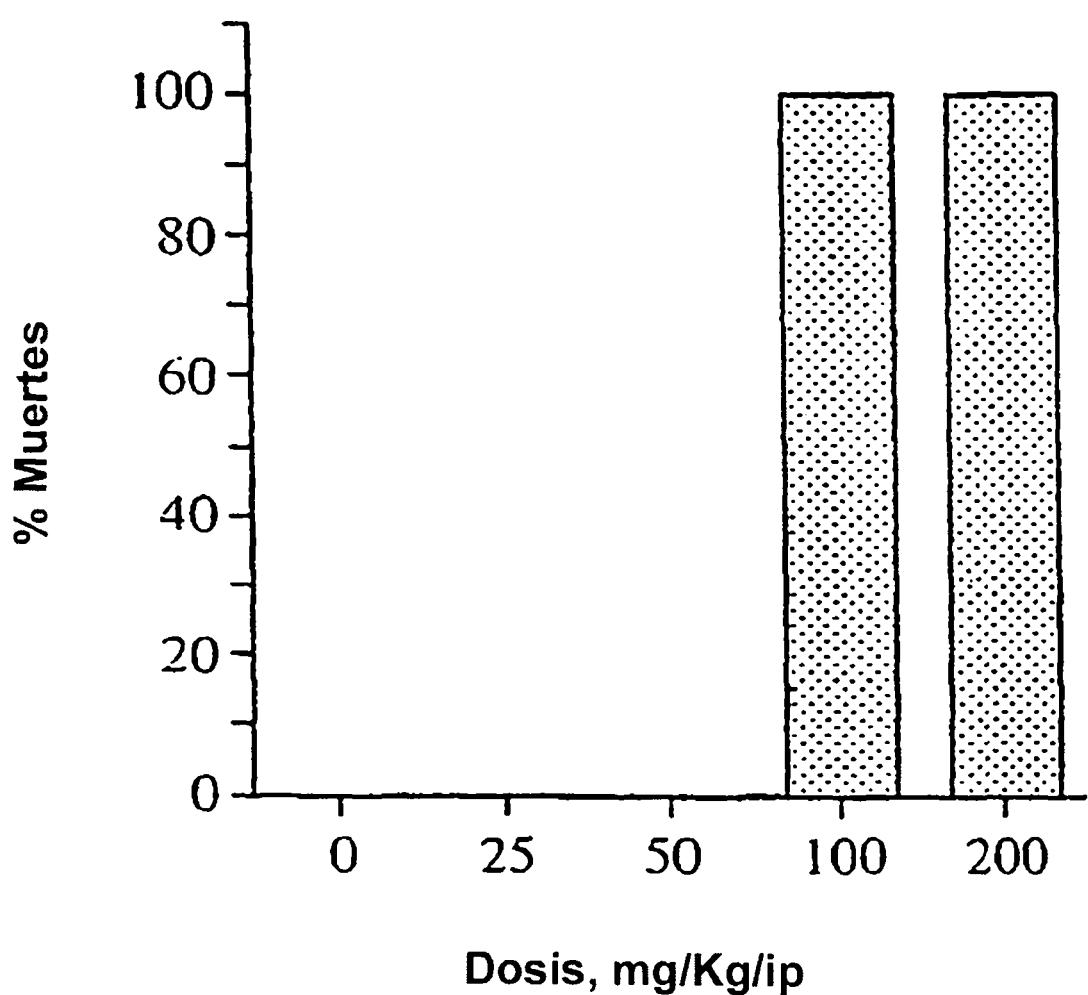


Figura 9

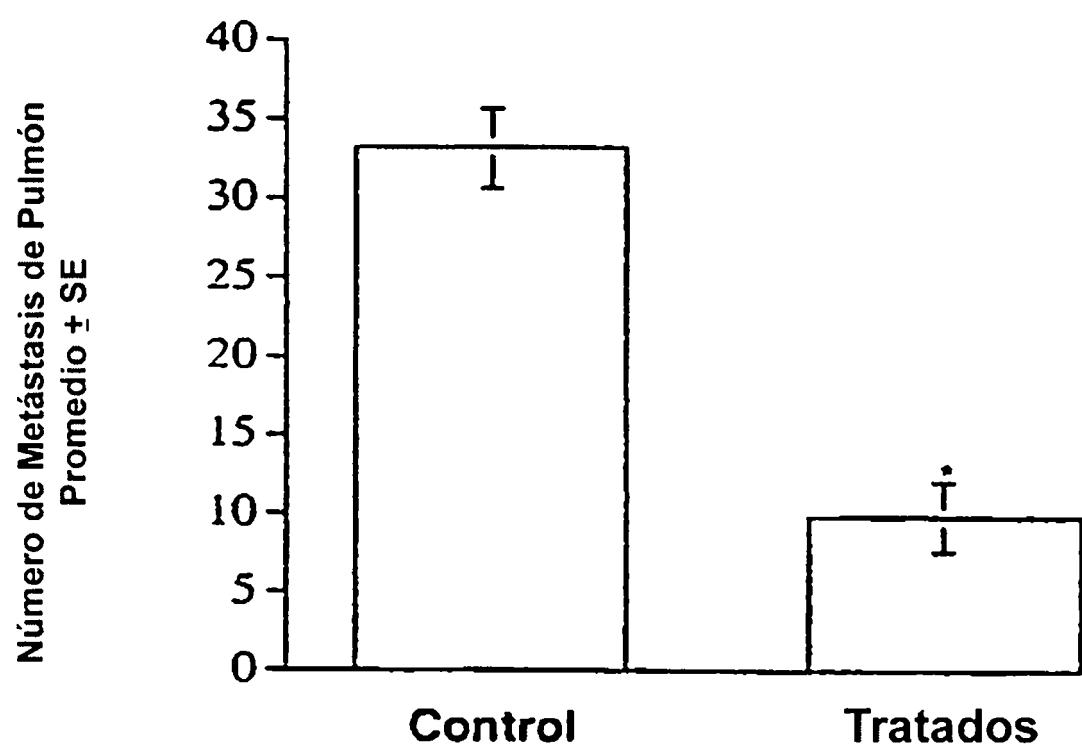


Figura 10

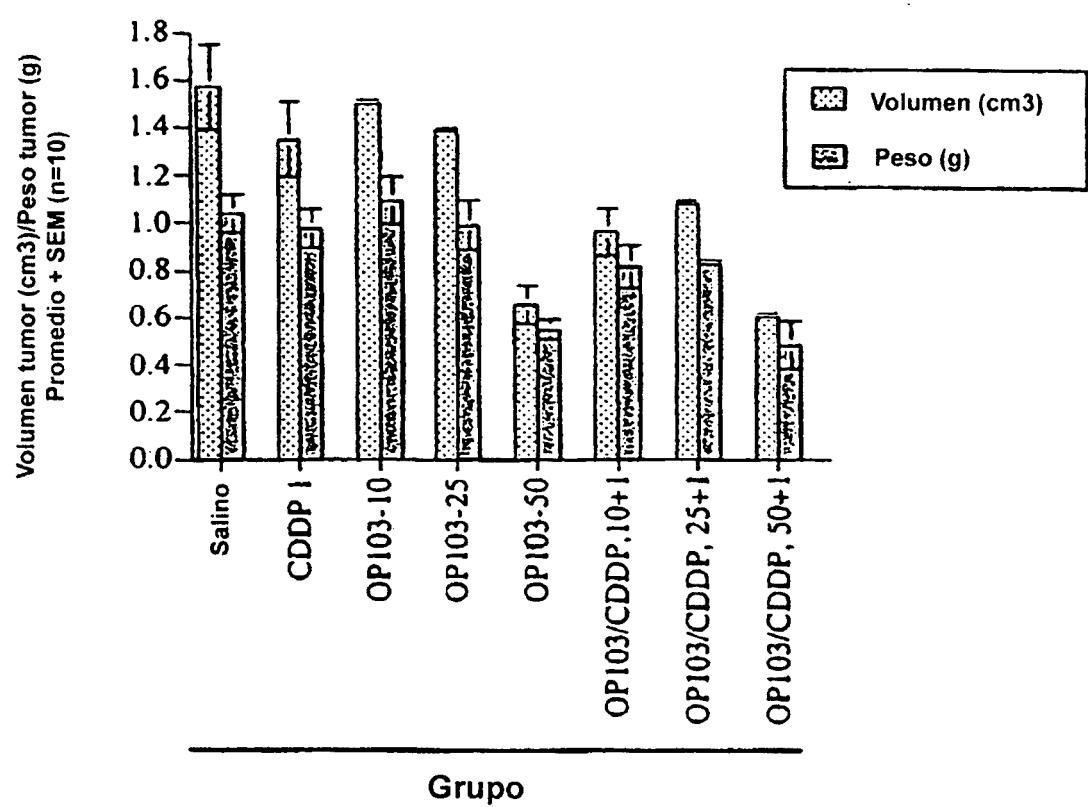


Figura 11

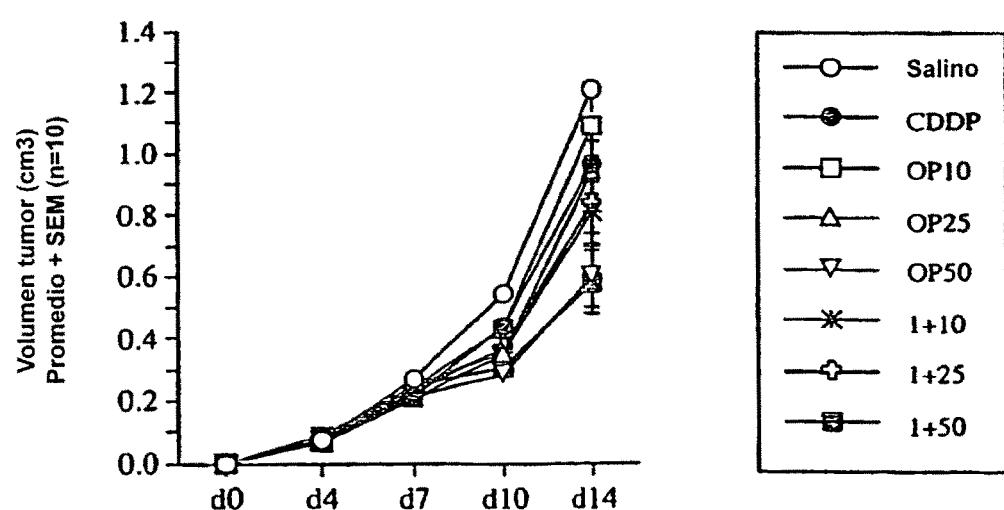
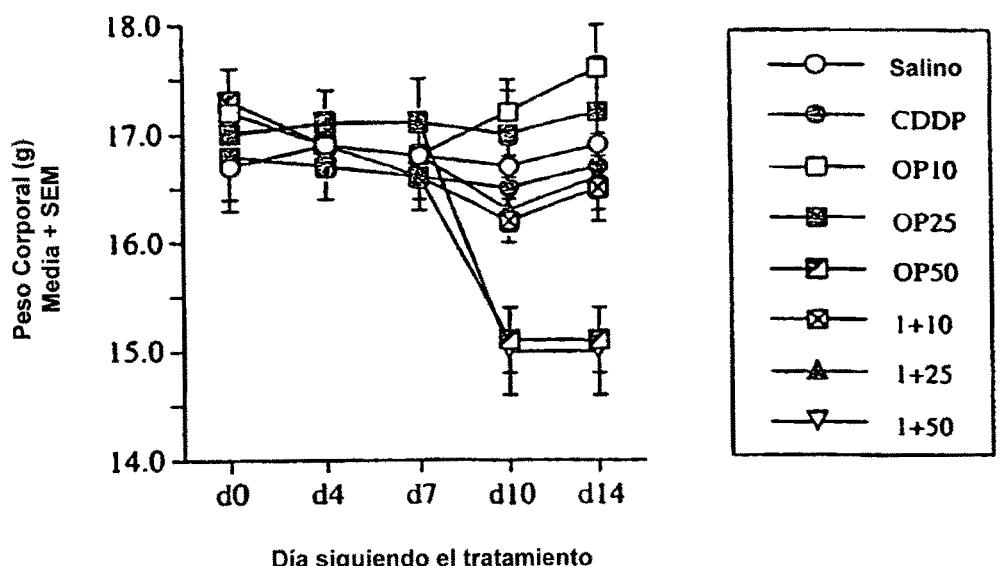


Figura 12

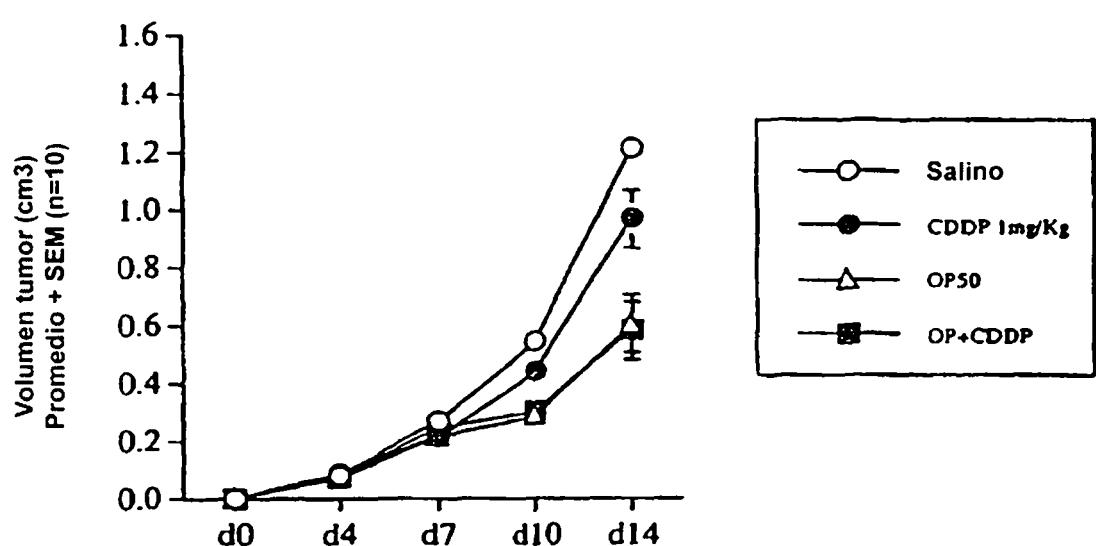
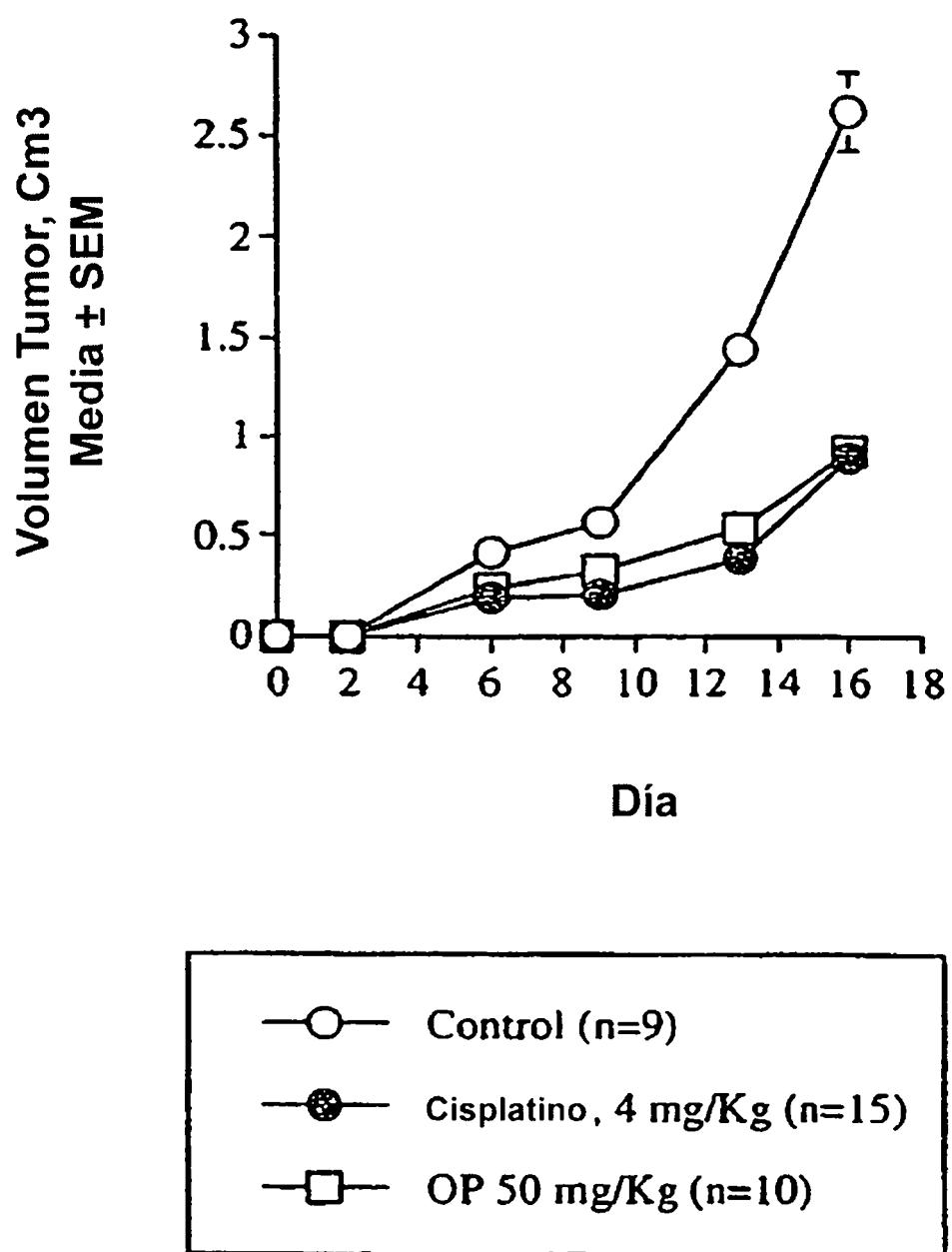


Figura 13



ES 2 327 313 T3

Figura 14a

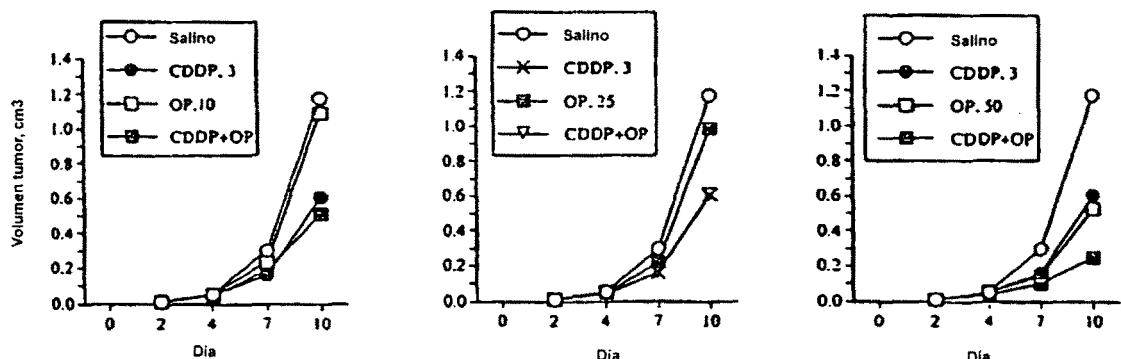


Figura 14b

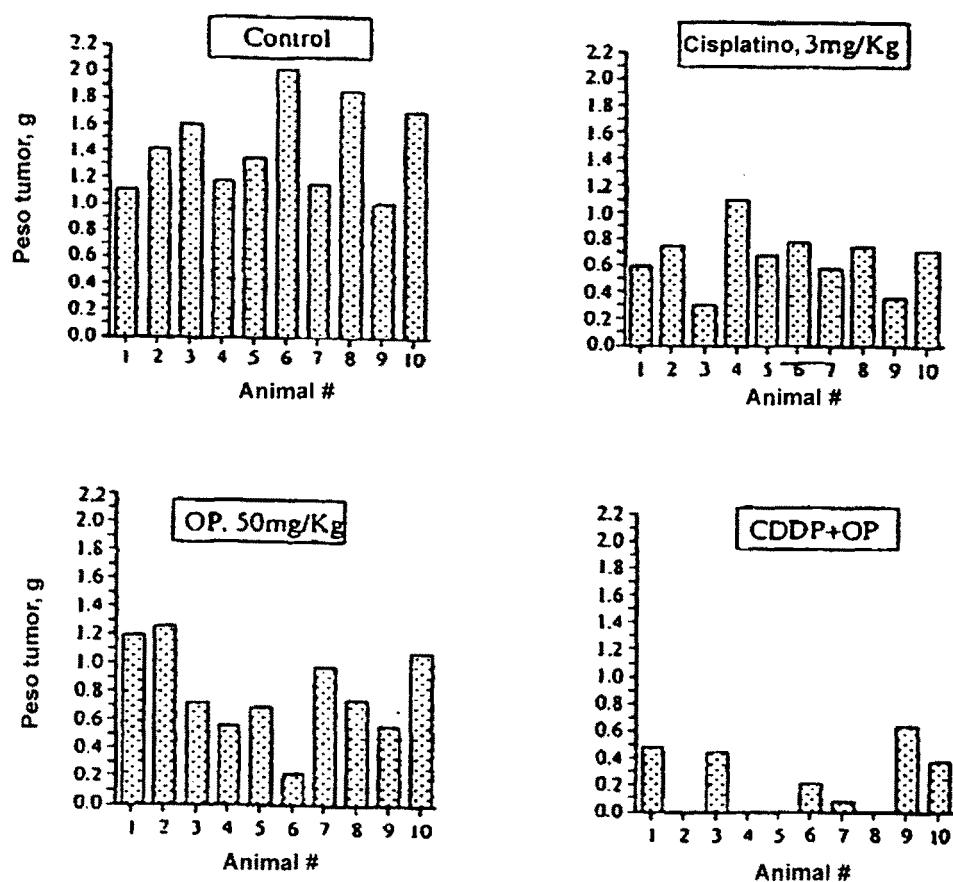


Figura 15

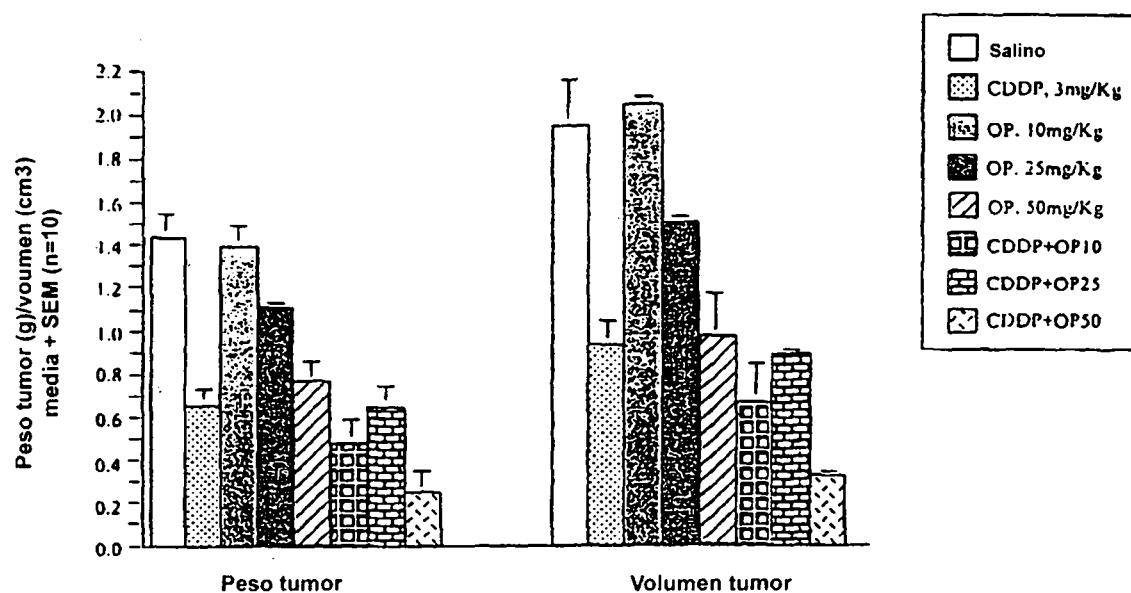


Figura 16

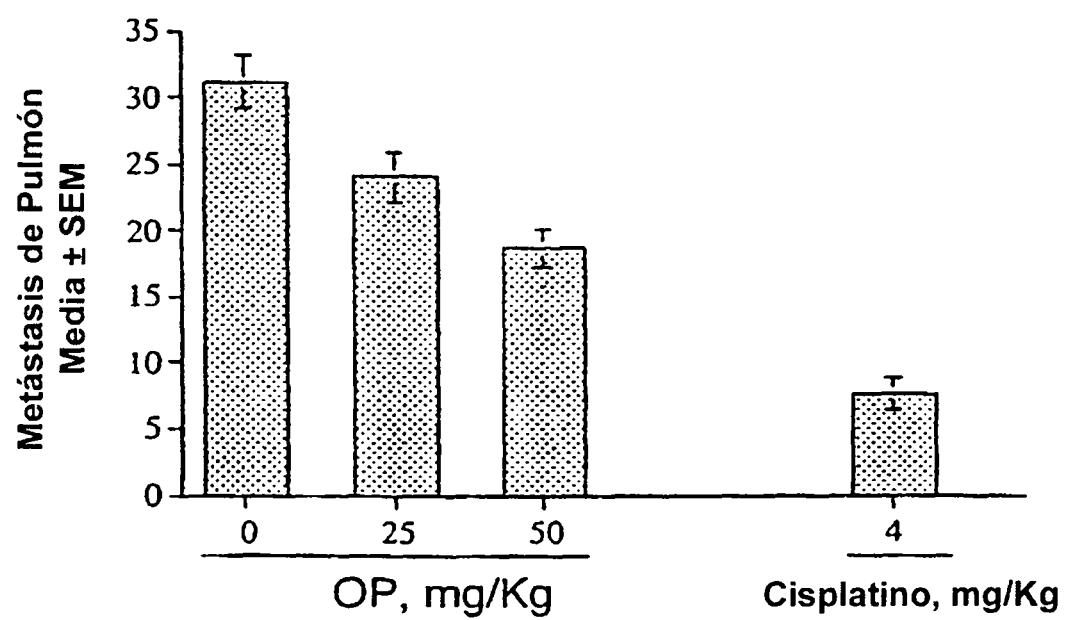


Figura 17

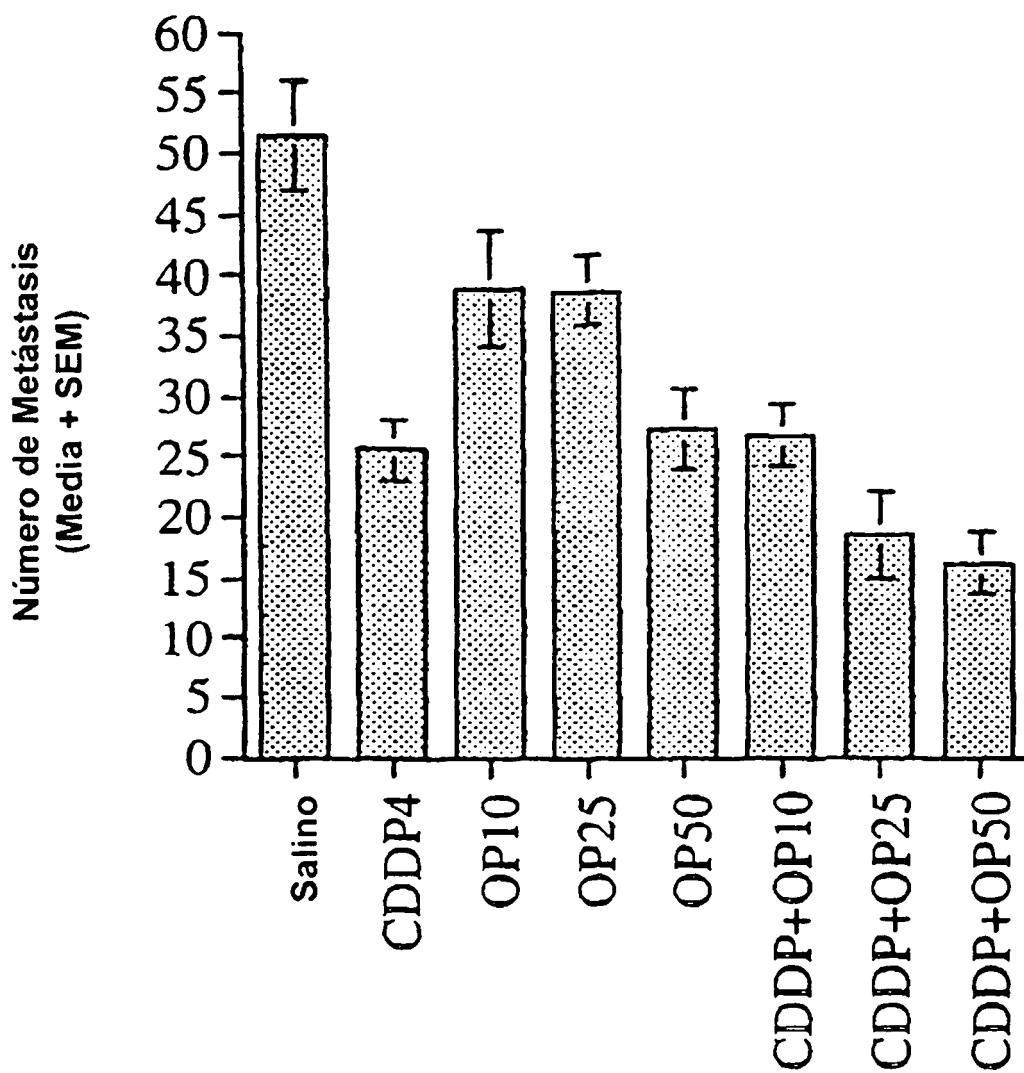


Figura 18

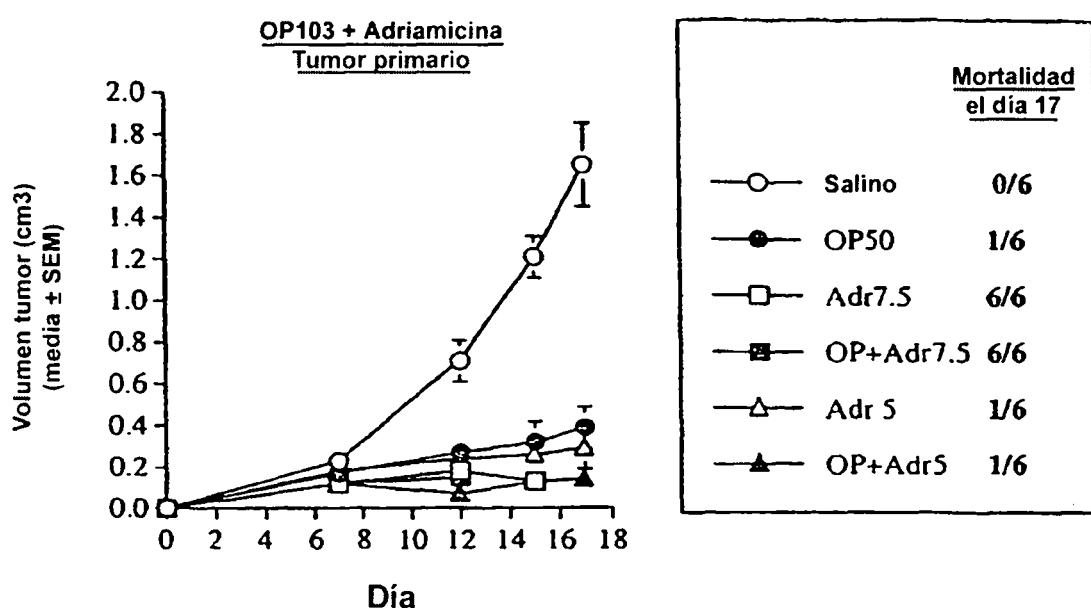


Figura 19

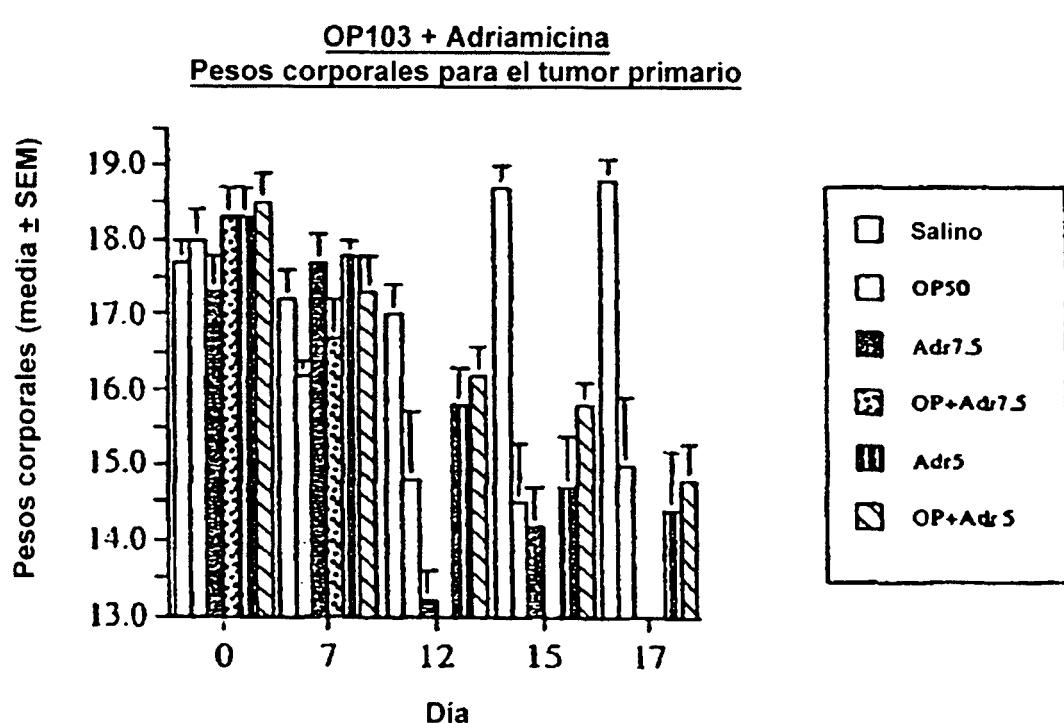


Figura 20

