



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 022**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/34** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05750803 .8**  
96 Fecha de presentación : **10.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1778215**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Potenciador del efecto antineoplásico.**

30 Prioridad: **10.06.2004 JP 2004-173174**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.05.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.05.2010**

73 Titular/es: **NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA**  
**11-2, Fujimi 1-chome**  
**Chiyoda-ku, Tokyo 102-8172, JP**

72 Inventor/es: **Yasuda, Hiroyasu;**  
**Yamaya, Mutsuo;**  
**Nakayama, Katsutoshi y**  
**Sasaki, Hidetada**

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 338 022 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

Potenciador del efecto antineoplásico.

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente potenciador para el efecto de un agente antineoplásico para conseguir un efecto terapéutico excelente sobre el cáncer.

## 10 Técnica antecedente

Se ha sabido bien que, como resultado de intensas investigaciones y del desarrollo de agentes antineoplásicos durante muchos años, diversos tipos de agentes antineoplásicos se están usando actualmente en quimioterapia para diversos tipos de cáncer y, de este modo, se consigue un efecto terapéutico. Sin embargo, también se ha sabido que no existe ningún agente antineoplásico que sea eficaz sobre todos los tipos de cáncer y existe una limitación para el efecto terapéutico del agente antineoplásico sobre el cáncer.

Como una de las causas de la limitación del efecto terapéutico sobre el cáncer de un agente antineoplásico, se ha descrito que las condiciones hipóxicas en el interior del cáncer sólido toma parte en la resistencia a su terapia. Por ejemplo, en el Documento no de Patente 1 (Matthews NE, Adams MA, Maxwell LR, Gofton TE, Graham CH. Nitric oxide-mediated regulation of chemosensitivity in cancer cells. J. Natl. Cancer Inst., 2001; 93: 1879-1885), se muestra que, en experimentos en los que se usan realmente varias clases de líneas celulares cancerosas, las condiciones hipóxicas promueven la resistencia de células cancerosas al agente antineoplásico. En ese documento queda claro que, cuando se mezcla un agente antineoplásico con medio de cultivo de líneas celulares cancerosas, la tasa de supervivencia es de hasta dos veces o más incluso aunque las células cancerosas se expongan directamente al agente antineoplásico en comparación con el caso en el que son expuestas en condiciones normóxicas, siempre que sean expuestas en condiciones hipóxicas. También queda claro que las condiciones hipóxicas suprimen una producción endógena de óxido nítrico (NO), con lo que potencian la resistencia de las células cancerosas al agente antineoplásico y que la administración de un donador de NO exógeno mejora la resistencia al agente antineoplásico mediante condiciones hipóxicas. Además de esto, en el Documento no de Patente 2 (Jordán BF, Misson PD, Demeure R, Baudalet C, Beghein N, Gallez B. Changes in tumor oxygenation/perfusion induced by the NO donor, Isosorbide dinitrate, In comparison with carbogen: monitoring by EPR and MRI. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2000; 48: 565-570), se sugiere que el dinitrato de isosorbida, que es un donador de NO, mejora la presión de oxígeno dentro del cáncer debido a un aumento del flujo sanguíneo. En el Documento no de Patente 3 (Liang BC. Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines. J. Neurooncol., 1996; 29: 149-155), queda claro que, cuando se coloca a una línea de células de glioma en condiciones hipóxicas, ésta muestra resistencia al agente antineoplásico. En el Documento no de Patente 4 (Sanna K, Rofstad EK. Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines *in vitro*. Int. J. Cancer, 1994; 58: 258-262), queda claro que, cuando se coloca una línea de células de melanoma humano en condiciones hipóxicas, ésta muestra resistencia al agente antineoplásico. Por lo tanto, de acuerdo con estos informes, incluso cuando el agente antineoplásico se distribuye simplemente en grandes cantidades en células cancerosas, la muerte de las células cancerosas no se acelera a menos que las condiciones hipóxicas en los tejidos tumorales mejoren. El Documento no de Patente 1 y el Documento no de Patente 2 sugieren que un donador de NO es capaz de funcionar eficazmente en la mejora de las condiciones hipóxicas en el interior del cáncer sólido.

Sin embargo, en ninguno de los informes, se demuestra que el NO realmente mejora el efecto terapéutico de un agente antineoplásico sobre el cáncer en medicina clínica humana. En su lugar, existen muchos informes que sugieren que el NO tiene la acción de aumentar el tamaño de tumor y promover su avance. Por ejemplo, en el Documento no de Patente 5 (Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, *et al.* Role of nitric oxide in angiogenesis in head and neck cancer. J. Natl. Cancer Inst., 1998; 90: 587-596), se investiga una NO sintasa (NOS) que participa en la producción de NO en la preparación de tejido de cáncer de cabeza y cuello humano y se muestra que, en casos de cáncer avanzado acompañado por metástasis en ganglio linfático, la cantidad expresada de NOS es alta y la densidad de vasos sanguíneos en el ganglio linfático es alta en un grupo en el que la metástasis en ganglio linfático es positiva. En ese documento, también se realiza una investigación que usa córnea de conejo para el efecto angiogénico tumoral del NO sobre tejidos cancerosos preparados a partir de casos de cáncer de cabeza y cuello humano. De acuerdo con esto, se sugiere que, en un grupo al que se le administra L-NAME que es un inhibidor de NOS, la angiogénesis tumoral es significativamente pequeña y el avance del cáncer se suprime en comparación con un grupo de control y se muestra que el NO tiene una acción promotora para el aumento y el avance de tejidos cancerosos mediante la angiogénesis tumoral. En el Documento no de Patente 6 (Edwards P, Cendab JC, Topping DB, Moldawer LL, Mackay S, Copeland EM, Lind DS. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth *in vitro*, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metástasis *in vivo*. J. Surg. Res., 1996; 63: 49-52), se muestra que, cuando se realiza un experimento que usa células cultivadas en las que la producción de NO se promueve mediante la estimulación con LPS/IFN- $\gamma$  usando células EMT-6 (línea celular de cáncer de mama de ratones), el crecimiento de células tumorales se suprime, mientras que, cuando las mismas células se transplantan en ratones BALB/c y se estimulan mediante LPS/IFN- $\gamma$ , los tejidos tumorales y la metástasis pulmonar aumentaban hasta un grado de dos veces en comparación con un grupo de control y que los resultados experimentales son totalmente opuestos entre un experimento que usa células cultivadas (experimento *in*

*vitro*) y un experimento en animales (experimento *in vivo*). En el Documento no de Patente 7 (Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, *et al.* p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nature Med.*, 1998; 4: 1371-1376), se investiga la influencia del NO sobre la angiogénesis y el avance del cáncer en un experimento en animales en el que una línea celular cancerosa humana en la que se introduce el gen de NOS para realizar una síntesis de NO de manera constante, se transplanta a ratones desnudos que no tienen timo. En este caso, se investiga la relación con la presencia/ausencia de una actividad del gen supresor del cáncer p53 y se muestra que, en tejidos tumorales en los que la línea celular cancerosa que tiene una actividad de p53 (p53 de tipo silvestre) se transplanta a ratones desnudos, un NO endógeno suprime el crecimiento de células tumorales mientras que, en tejidos tumorales en los que una línea celular cancerosa que tiene una mala actividad de p53 (p53 mutante) se transplanta a ratones desnudos, el NO endógeno promueve la expresión de VEGF y la angiogénesis, y promueve el crecimiento de células tumorales. En el Documento no de Patente 8 (DC Jenkins, IG Charles, LL Thomsen, DW Moss, LS Holmes, SA Baylis, P Rhodes, K Westmore, PC Emson, S Moneada. Roles of Nitric Oxide in Tumor Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 4392-4396), se muestra que, en cáncer de mama humano y cáncer en un ámbito ginecológico, la producción de NO y el crecimiento del cáncer muestran una correlación positiva. En el Documento no de Patente 9 (Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.*, 2001; 2: 149-156), se muestra que NOS de un tipo derivado participa en la mutación de p53 de tumor de colon, pulmón y garganta y que NO estimula el crecimiento del tumor mediante la activación de ciclooxigenasa-2 (COX-2). Por lo tanto, de acuerdo con estos informes, se sugiere enérgicamente que, a la hora de establecer una terapia de cáncer mediante un agente antineoplásico en medicina clínica humana, el uso de NO presenta la posibilidad de causar efectos adversos para pacientes, tales como el aumento o el avance del cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, con respecto a una acción de NO para el cáncer, cada uno de los informes que mencionan que participa en la dirección de suprimir el cáncer y los informes que mencionan que participa en la dirección de empeorar el cáncer están presentes en gran número, estando apoyados por pruebas científicas y, por lo tanto, una evaluación científica se encuentra en un estado caótico. Además, como se muestra en el Documento no de Patente 6, nunca es raro que los resultados experimentales sean totalmente contrarios entre un experimento que usa células cultivadas y un experimento en animales. En vista de tales circunstancias, en el Documento no de Patente 1 por ejemplo, se muestra que la resistencia de una línea celular cancerosa a un agente antineoplásico inducida por condiciones hipóxicas mejora mediante un donador de NO en un experimento que usa células cultivadas y, aunque dicho descubrimiento será seguramente valioso para mostrar una dirección para futuras investigaciones, no es posible concluir a partir de dicho descubrimiento que un donador de NO tiene la acción de reducir los tejidos cancerosos o la acción de potenciar el efecto de un agente antineoplásico. Por lo tanto, queda aún más claro que, en medicina clínica humana, no se puede llegar y no se debe llegar a la conclusión de que un donador de NO mejora el efecto de un agente antineoplásico.

El documento de Pipili-Synetos *et al.*, "inhibition of angiogenesis, tumor growth and metástasis by the NO-releasing vasodilators, isosorbide mononitrate and dinitrate", *British Journal of Pharmacology* (1995) 116, 1829-1834 describe el efecto de los vasodilatadores productores de óxido nítrico mononitrato de isosorbida y dinitrato de isosorbida sobre el crecimiento y las propiedades metastáticas del carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) en ratones.

El documento de Jordán *et al.*, "Potentiation of Radiation-induced Regrowth Delay by Isosorbide Dinitrate in FSAII Murine Tumors" *Int. J. Cancer*, 103, 138-141 (2003) describe que el dinitrato de isosorbida es útil para aumentar la accesibilidad de los agentes quimiosensibilizadores al tumor, particularmente en términos de modificación de la respuesta del tumor a la irradiación.

El documento WO 03/074082 A1 describe un método para controlar, tratar y/o prevenir el cáncer, tumores, neoplasma, hiperplasia, hipertrofia, dispiasia y/o angiogénesis tumoral, comprendiendo dicho método: administrar un mimético de óxido nítrico a un animal que lo padece, para controlar, tratar y/o prevenir dichos cáncer, tumores, neoplasma, hiperplasia, hipertrofia, dispiasia y/o angiogénesis tumoral.

En el Documento de Patente 1 (JP 2004-509279 A), se propone un método de administrar un donador de NO como activador de los canales de potasio como un método para una transferencia selectiva de un agente antineoplásico a un cáncer en el que se mejora la permeabilidad de un vaso sanguíneo para enviar sangre a células cancerosas con agente antineoplásico. Sin embargo, llegar a la súbita conclusión de que un donador de NO potencia el efecto de un agente antineoplásico solamente recurriendo a un aumento de la transición de un agente antineoplásico a tejidos tumorales mediante un aumento de la permeabilidad a través del vaso sanguíneo sin verdadera confirmación de la potenciación del donador de NO en la acción del agente antineoplásico sobre los tejidos cancerosos, incluso en un experimento en animales no es convincente en absoluto en el presente estatus, en el que la evaluación científica para la acción de NO sobre el cáncer está sumida en el caos, como se ha mencionado anteriormente. El Documento de Patente 1 está lejos de la conclusión de que un donador de NO da como resultado la potenciación del efecto de un agente antineoplásico en medicina clínica humana real. De hecho, con respecto a los datos que muestran que la mejora del efecto terapéutico para el cáncer podía conseguirse mediante ese método, en el Documento de Patente 1 no hay datos disponibles ni siquiera para un experimento en animales.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un agente potenciador para el efecto de un agente antineoplásico para conseguir un efecto terapéutico excelente sobre el cáncer.

## 5 Descripción de la invención

En las circunstancias en las que, incluso en experimentos en animales, no se llega a la conclusión de qué efecto está disponible mediante la administración de un donador de NO a tejidos cancerosos, los presentes inventores han descubierto en este momento que un donador de NO mejora espectacularmente el efecto terapéutico de un agente antineoplásico sobre cáncer de pulmón macrocítico, que se cree que es uno de los cánceres más difíciles de tratar mediante quimioterapia. Uno de los antecedentes para ello es una investigación clínica retrospectiva en pacientes con angina de pecho o un antiguo infarto de miocardio tratados con un donador de NO. Esto es porque existe una base de un análisis de datos en el que la tasa de respuesta mediante quimioterapia es significativamente bastante más alta en un grupo que padece cáncer de pulmón macrocítico avanzado y que recibe una quimioterapia (terapia de MVP) (grupo en el que se usa NO conjuntamente; edad:  $67 \pm 8$ ; proporción de varones: 80%) que en un grupo que no usa ningún donador de NO y que recibe la misma terapia de MVP (grupo de control; edad:  $65 \pm 9$ ; proporción de varones: 76%) donde la oportunidad relativa = 30,6, 95% Intervalo de Confianza 3,5-270,4,  $p < 0,0001$ , test de Chi cuadrado. En los datos, la tasa de respuesta del grupo en el que se usó NO conjuntamente era del 90% (CR: 20%, 2/10; PR: 70%, 7/10; NC: 10%, 1/10; PD: 0%, 0/10) mientras que la tasa de respuesta del grupo de control era del 23% (CR: 0%, 0/44; PR: 23%, 10/44; NC: 50%, 22/44; PD: 27%, 12/44) (Con respecto al método para la evaluación, remítase a los Ejemplos que se mencionarán a continuación).

La presente invención se ha realizado sobre la base del descubrimiento mencionado anteriormente. De acuerdo con la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto de nitrato orgánico como donador de óxido nítrico para la fabricación de un agente potenciador para el efecto de un agente antineoplásico de acuerdo con la reivindicación 1.

De acuerdo con la presente invención, el cáncer que es objeto del tratamiento es un cáncer sólido.

De acuerdo con la presente invención, el cáncer sólido es cáncer de pulmón macrocítico o cáncer de colon.

De acuerdo con la presente invención, el donador de NO es un compuesto de nitrato orgánico.

De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar un agente potenciador para el efecto de un agente antineoplásico para conseguir un efecto terapéutico excelente sobre el cáncer.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un dibujo que muestra curvas de tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón macrocítico avanzado tratados con donadores de NO {NO(+)} (línea continua) y sin donadores de NO {NO(-)} (línea de puntos) durante la quimioterapia. El valor P se calculó mediante el test Log-rank.

La figura 2 muestra las curvas de crecimiento de volumen del tumor en un modelo de cáncer de pulmón (Carcinoma de pulmón de Lewis murino; células LLC) en ratones C57BL6 (Grupo de control,  $n = 6$ ; C, grupo del donador de NO,  $n = 6$ ; N, grupo de quimioterapia,  $n = 6$ ; CTX, y grupo de NO más quimioterapia,  $n = 6$ ; N+CTX). El volumen del tumor se calculó como  $0,5 \times \{\text{longitud del tumor (mm)}\} \times \{\text{anchura del tumor (mm)}\}^2$ . El valor P se calculaba mediante el test t de Student.

La figura 3 muestra las curvas de crecimiento de volumen del tumor en un modelo de cáncer de colon (línea celular de cáncer de colon murino; células de colon 26) en ratones BALB/c (Grupo de control,  $n = 6$ ; C, grupo donador de NO,  $n = 6$ ; N, grupo de quimioterapia,  $n = 6$ ; CTX, y grupo de NO más quimioterapia,  $n = 6$ ; N+CTX). El volumen del tumor se calculó como  $0,5 \times \{\text{longitud del tumor (mm)}\} \times \{\text{anchura del tumor (mm)}\}^2$ . El valor P se calculaba mediante el test t de Student.

## Mejor modo de realizar la invención

En la presente invención, un donador de óxido nítrico (NO) significa un agente que es capaz de liberar NO en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, compuestos de nitrato orgánico que son ésteres nítricos de alcohol monohídrico o polihídrico se incluyen en esta categoría. Sus ejemplos representativos son nitroglicerina (NTG), tetranitrato de pentaeritritol (PETN), dinitrato de isosorbida (ISDN) y mononitrato de isosorbida (ISMN).

No existe ninguna limitación particular para un agente antineoplásico que se usa en quimioterapia donde el efecto es potenciado mediante el uso concomitante de un donador de NO y sus ejemplos son antimetabolitos ejemplificados mediante 5-fluorouracilo, metotrexato, doxifluridina, tegafur, citarabina y gemcitabina; agentes alquilantes ejemplificados por ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, carboquona y clorhidrato de nimustina; antibióticos antineoplásicos ejemplificados por mitomicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de amurubicina, clorhidrato de pirarubicina,

clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de aclarubicina, clorhidrato de mitoxantrona, clorhidrato de bleomicina y sulfato de peplomicina; agentes que actúan sobre los microtúbulos ejemplificados por docetaxel, paclitaxel, vincristina, vindesina y vinorelbina; agentes a base de platino ejemplificados por cisplatino, carboplatino y nedaplatino; inhibidores de topoisomerasa ejemplificados por irinotecano y clorhidrato de nogitecano; y agente agentes antineoplásicos alcaloideos ejemplificados por etopósido.

Con respecto a un donador de NO, es un ejemplo que se inicie su administración a un paciente que se ha sometido a una quimioterapia convencional de 5 a 2 días antes del inicio de la quimioterapia (preferentemente, 3 días antes), la administración continua durante el periodo de quimioterapia y, en la fase en la que termina la quimioterapia, se interrumpe la administración. Aunque no existe ninguna limitación particular para la forma de dosificación del donador de NO, se prefiere que sea una preparación oral o una preparación subcutánea en la que el control de la concentración en sangre sea fácil cuando se tiene en cuenta el riesgo de expresión de resistencia. La dosis puede estar de acuerdo con una dosis en el tratamiento de angina de pecho que es un uso inherente de un donador de NO. Para ser más específico, cuando se usa nitroglicerina, la administración puede ser en una dosis de 1 a 50 mg/día (estando dividida en dos administraciones al día) en el caso de administración oral por medio de comprimidos o similares y de 1 a 50 mg/día (aplicados una vez al día) en el caso de administración por vía transdérmica por medio de un emplastro o similares. Cuando se usa dinitrato de isosorbida, la administración puede ser en una dosis de 10 a 100 mg/día (estando dividida en dos administraciones al día) en el caso de administración oral y de 10 a 100 mg/día (aplicados una vez al día) en el caso de administración por vía transdérmica. A propósito, la descripción anterior no niega la administración de un donador de NO en forma de una preparación combinada con un agente antineoplásico.

Es un objeto de la presente invención usar el compuesto de nitrato orgánico para la fabricación de un agente potenciador para el tratamiento de cáncer sólido tal como cáncer de colon o cáncer de pulmón.

## Ejemplos

La presente invención se describirá de la siguiente manera.

### Ejemplo 1

*Un estudio del efecto del uso concomitante de donadores de NO con agentes antineoplásicos sobre la respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón macrocítico avanzado en un ensayo controlado aleatorizado prospectivo*

#### *Características de los sujetos*

Sesenta y seis pacientes con cáncer de pulmón macrocítico avanzado inoperable (NSCLC) cumplían los siguientes cinco criterios y fueron reclutados en este estudio: (a) fase IIIB o fase IV; (b) ningún tratamiento anterior con quimioterapia ni radioterapia; (c) buen grado de actividad: un grado de actividad de 0-2 de acuerdo con la escala del *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG); (d) sin metástasis cerebral; (e) función renal, función hepática, función hematológica y función cardíaca adecuadas.

De los 65 pacientes con NSCLC avanzado, 31 pacientes presentaban carcinoma de células escamosas (19 pacientes en la fase IIIB y 12 pacientes en la fase IV), 29 pacientes presentaban adenocarcinoma (9 pacientes en la fase IIIB y 20 pacientes en la fase IV), 5 pacientes presentaban carcinoma macrocítico (4 pacientes en la fase IIIB y 1 paciente en la fase IV), y todos los pacientes se asignaron aleatoriamente para recibir agentes antineoplásicos con o sin donadores de NO durante quimioterapia en un estudio de cohorte prospectivo.

Treinta y dos de los 65 pacientes con NSCLC avanzado fueron tratados con quimioterapia con un donador de NO (nitroglicerina aplicada por vía transdérmica, Nitroderm TTS®, 25 mg/cuerpo diariamente, o dinitrato de isosorbida administrado por vía oral, Nitrol R®, 40 mg/cuerpo diariamente dividida en dos administraciones, entre 3 días antes del inicio de cada ciclo de quimioterapia y la finalización de la administración de agentes antineoplásicos). En el grupo tratado con un donador de NO, 21 de los 32 pacientes se trataron con MVP, cisplatino (CDDP) más vinorelbina (VNR) más mitomicina (CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> día 1, VNR 25 mg/m<sup>2</sup> día 1 y 8, mitomicina 8 mg/m<sup>2</sup> día 1, cada 21 días), 6 de los 32 pacientes se trataron con CDDP más docetaxel (DOC) (CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> día 1, DOC; 75 mg/m<sup>2</sup> día 1, cada 21 días), y 5 de los 32 pacientes se trataron con CDDP más VNR (CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> día 1, VNR 25 mg/m<sup>2</sup> día 1 y 8, cada 21 días). Otros 33 de los 65 pacientes con NSCLC avanzado se trataron con quimioterapia sin ningún donador de NO. En el grupo tratado sin donador de NO, 18 de los 33 pacientes se trataron con MVP, CDDP más VNR más mitomicina (CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> día 1, VNR 25 mg/m<sup>2</sup> día 1 y 8, mitomicina 8 mg/m<sup>2</sup> día 1, cada 21 días), 8 de los 33 pacientes se trataron con CDDP más DOC (CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> día 1, DOC; 75 mg/m<sup>2</sup> día 1, cada 21 días), y 7 de los 33 pacientes se trataron con CDDP más VNR (CDDP 80 mg/m<sup>2</sup> día 1, VNR 25 mg/m<sup>2</sup> día 1 y 8, cada 21 días). Las características de los sujetos en la rama A y en la rama B se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

*Características de pacientes con cáncer de pulmón macrocítico avanzado*

Características	Con miméticos de NO (brazo A, n = 32)	Sin miméticos de NO (brazo B, n = 33)	Valor p
Edad (años)*			
Mediana	68	67	0,2615
Intervalo	41-83	48-84	
Género (Nº de pacientes)			
Varón	29	24	0,063
Mujer	3	9	
Grado de actividad (Nº de pacientes)			
0	23	23	0,8469
1	6	6	0,9529
2	3	4	0,721
Índice de Brinkman (paquetes al año)			
Mediana	49	47	0,6334*
Intervalo	0-120	0-125	
Tipo de célula (Nº de pacientes)			
Célula escamosa	18	13	0,1737
Adenocarcinoma	10	19	0,0328
Macrocito	4	1	0,1520
Fase (Nº de pacientes)			
IIIB	17	15	0,5363
IV	15	18	
Quimioterapia (Nº de pacientes)			
MVP	21	18	0,362
CDDP+DOC	6	8	0,5902
CDDP+VNR	5	7	0,5616

MVP = mitomicina C+vinorelbina+cisplatino, CDDP = cisplatino, DOC = docetaxel,

VNR = vinorelbina,

Dos factores marcados \* se evaluaron estadísticamente con el test U de Mann-Whitney.

Otros factores se evaluaron con el test de Chi cuadrado

*Métodos*

Se usaron donadores de NO entre 3 días antes del inicio de cada ciclo de quimioterapia y la finalización de la administración de agentes antineoplásicos. Para evaluar los efectos de donadores de NO sobre la quimiosensibilidad, comparamos los tamaños de los tumores con la tomografía computarizada (TAC) del pecho antes y después del tratamiento con agentes antineoplásicos. La estadificación ganglionar del cáncer de pulmón se determinó usando un TAC y una gammagrafía del pecho con citrato de galio-67. La metástasis en el cerebro, el abdomen y el hueso se determinó usando un TAC del cerebro y el abdomen, y una gammagrafía con Tecnecio-99m del hueso. La respuesta completa (CR) se definió como la desaparición de toda enfermedad conocida determinada mediante dos observaciones separadas por no menos de dos semanas. La respuesta parcial (PR) se definió como una disminución del 50% o más del tamaño total del tumor de aquellas lesiones medidas durante dos observaciones separadas por no menos de cuatro semanas. Sin cambios (NC) se definió como casos en los que una disminución del 50% en el tamaño total del tumor no podía establecerse, y tampoco había un aumento del 25% o más del tamaño de una o más lesiones medibles. Enfermedad progresiva (PD) se definió como un aumento del 25% o más del tamaño de una o más lesiones medibles o la aparición de nuevas lesiones. Los pacientes se clasificaron como sensibles cuando experimentaban PR o CR. Los pacientes con NC o PD se clasificaron como no sensibles. La tasa de respuesta a la quimioterapia se calculó mediante el número de sensibles dividido por el número de sensibles más no sensibles. La supervivencia se calculó a partir de la fecha del primer día del primer ciclo de la quimioterapia hasta la fecha de la muerte o una fecha límite para pacientes vivos en el momento del cierre del conjunto de datos.

Los factores asociados a la respuesta a la quimioterapia se evaluaron mediante análisis unifactorial (test de Chi cuadrado) y análisis multifactorial (análisis de regresión logística). Se realizaron análisis de regresión de Cox para evaluar la significación de diagnóstico de las variables. Analizamos la tasa de supervivencia con el método de Kaplan-Meire, y el valor p de las curvas de supervivencia entre pacientes tratados con agentes antineoplásicos y donadores de NO y pacientes tratados con agentes antineoplásicos en solitario con el test Log-rank. La significación se aceptó a  $p < 0,05$ .

*Explicación del término técnico (Nº 1)**Grado de actividad de ECOG (PS)*

Grado	ECOG
0	Completamente activo, capaz de realizar toda la actividad previa a la enfermedad sin restricciones
1	Restringido en actividad física extenuante pero ambulatorio y capaz de realizar trabajos de naturaleza ligera o sedentaria, por ejemplo trabajos domésticos y trabajos de oficina
2	Ambulatorio y capaz de atender sus necesidades pero incapaz de realizar ninguna actividad laboral. En pie aproximadamente más del 50% de las horas de vigilia
3	Capaz de atender sus necesidades solo de forma limitada, confinado a una cama o silla más del 50% de las horas de vigilia
4	Completamente impedido. No puede atender ninguna de sus necesidades. Totalmente confinado a una cama o silla
5	Muerto

\* Am J Clin Oncol 5: 649-655, 1982.

*Explicación de término técnico (Nº 2)*

Índice de Brinkman: un historial de tabaquismo calculado multiplicando el número de cigarrillos consumidos en un día (número de paquetes de cigarrillos) por la duración del consumo (años).

*Resultados*

Las características de los sujetos en grupos de sensibles y no sensibles se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3. Las curvas de supervivencia para el grupo tratado con donadores de NO y el grupo tratado sin donadores de NO calculadas mediante análisis de Kaplan-Meier se muestran en la figura 1.

TABLA 2

*Análisis de factores de riesgo para quimioterapia evaluados mediante análisis multifactorial*

Características	PR+CR (Sensible) (n = 39)		NC+PD (no sensible) (n = 26)		Análisis multifactorial
					Valor p
Edad (años)					
65≥	30	(67%)	15	(33%)	0,792
65>	9	(45%)	11	(55%)	
Género (Nº de pacientes)					
Varón	35	(66%)	18	(34%)	0,438
Mujer	4	(33%)	8	(67%)	
Grado de actividad (Nº de pacientes)					
0	28	(61%)	18	(39%)	0,927
1	6	(50%)	6	(50%)	
2	5	(71%)	2	(29%)	
Índice de Brinkman (paquetes al año)					
50≥	20	(74%)	7	(26%)	0,899
50<	19	(50%)	19	(50%)	



# ES 2 338 022 T3

	Tipo de célula (Nº de pacientes)					
5	Célula escamosa	26	(84%)	5	(16%)	0,011
	Adenocarcinoma	10	(34%)	19	(66%)	-
10	Macrocyto	3	(60%)	2	(40%)	0,948
	Clasificación por fases (Nº de pacientes)					
15	IIIB	24	(75%)	8	(25%)	0,098
	IV	15	(45%)	18	(55%)	
20	Quimioterapia (Nº de pacientes)					
	MVP	26	(67%)	13	(33%)	0,199
25	CDDP+DOC	7	(50%)	7	(50%)	0,358
	CDDP+VNR	6	(50%)	6	(50%)	-
30	Capacidad Vital (% predicho)					
	<80%	7	(78%)	2	(22%)	0,724
35	≥80%	32	(57%)	24	(43%)	
	Volumen espiratorio forzado en 1 segundo (% predicho)					
40	<70%	18	(72%)	7	(28%)	0,299
	≥70%	21	(53%)	19	(47%)	
45	Uso de miméticos de NO (Nº de pacientes)					
	Si	26	(81%)	6	(19%)	0,007
50	No	13	(39%)	20	(61%)	
	Uso de vasodilatador excepto miméticos de NO (Nº de pacientes)					
55	Si	18	(69%)	8	(31%)	0,246
	No	21	(54%)	18	(46%)	
60	CR = respuesta completa, PR = respuesta parcial, NC = sin cambios, PD = enfermedad progresiva, NO = óxido nítrico, MVP = mitomicina C + vinorelbina + cisplatino, CDDP = cisplatino, DOC = docetaxel, VNR = vinorelbina.					
65	El análisis multifactorial se realizó con análisis de regresión logística.					

TABLA 3

*Relación entre el uso de donadores de NO y fármacos antineoplásicos y quimiosensibilidad en una investigación clínica*

	Fármacos antineoplásicos	Sensible; CR+PR (Número)		No sensible, NC+PD (Número)	
El uso de donadores de NO (+)	MVP	17	26	4	6
	CDDP+DOC	5		1	
	CDDP+VNR	4		1	
El uso de donadores de NO (-)	MVP	9	13	9	20
	CDDP+DOC	2		6	
	CDDP+VNR	2		5	

**CR = respuesta completa, PR = respuesta parcial, NC = sin cambios, PD = enfermedad progresiva, NO = óxido nítrico, MVP = mitomicina C + vinorelbina + cisplatino, CDDP = cisplatino, DOC = docetaxel, VNR = vinorelbina.**

No había significación estadística entre pacientes con NSCLC avanzado tratados con agentes antineoplásicos y donadores de NO y pacientes tratados con agentes antineoplásicos en solitario en edad, género, grado de actividad, historial de tabaquismo, fase del cáncer de pulmón y protocolo de quimioterapia (Tabla 1). Se reconocieron efectos fuertes y notables del uso de donadores de NO combinados con agentes antineoplásicos sobre la tasa de respuesta a quimioterapia en pacientes con NSCLC avanzado como se muestra en la Tabla 2 y la Tabla 3. La tasa de respuesta en pacientes tratados con donadores de NO durante la quimioterapia (81%, 26 de 32 pacientes) era significativamente más alta que en pacientes tratados sin donadores de NO (39%, 13 de 33 pacientes) (oportunidad relativa = 6,7, 95% Intervalo de Confianza 2,2-20,7,  $p = 0,0006$ , test de Chi cuadrado) (Tabla 2). El uso de donadores de NO ( $p < 0,01$ ) estaba significativamente asociado con una respuesta positiva a agentes antineoplásicos en pacientes con NSCLC avanzado (análisis de regresión logística) (Tabla 2). El análisis de Kaplan-Meier mostraba que la supervivencia en pacientes tratados con agentes antineoplásicos y donadores de NO era significativamente mayor que en pacientes tratados con agentes antineoplásicos en solitario ( $p < 0,05$ ) (test de Log-rank). Estos resultados (Tabla 2 y Tabla 3) sugieren que el uso de donadores de NO, tales como nitroglicerina y dinitrato de isosorbida, puede mejorar la respuesta a quimioterapia en pacientes en la fase IIIB o fase IV de NSCLC avanzado.

### Conclusiones

El uso de donadores de NO combinados con agentes antineoplásicos resultó tener un gran efecto adicional sobre la mejora de la tasa de respuesta a quimioterapia y supervivencia global en pacientes con NSCLC avanzado en comparación con las de pacientes tratados con agentes antineoplásicos sin donadores de NO.

El tratamiento de NSCLC avanzado, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y carcinoma macrocítico sigue siendo muy difícil, puesto que el NSCLC avanzado no es operable y la tasa de respuesta a agentes antineoplásicos, incluso aunque sean los más nuevos agentes antineoplásicos de tercera generación, es muy baja. Por el contrario, la tasa de respuesta a quimioterapia en cáncer de pulmón microcítico es de aproximadamente el 70-80% y es significativamente más alta que en NSCLC. El número de pacientes con cáncer de pulmón se ha estado incrementando en la mayoría de los países del mundo año tras año, al contrario que el número de pacientes con cáncer gástrico. Además, una gran proporción de cáncer de pulmón consiste en NSCLC. Por lo tanto, debe establecerse de inmediato un nuevo régimen para NSCLC avanzado más eficaz que el que existe actualmente. Sobre este punto, la presente invención puede tener una gran importancia sobre la mejora de la tasa de respuesta no solamente a NSCLC sino a otros tipos de cáncer sólido avanzado.

## Ejemplo 2

*El uso concomitante de un donador de NO, nitroglicerina, mejora la quimiosensibilidad en un modelo de cáncer de pulmón murino*

5

*Métodos*

Células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) murino, células de adenocarcinoma de pulmón, se obtuvieron del *Tohoku University Cell Resource Center for Biomedical Research* y se incubaron con DMEM más suero fetal bovino al 10% hasta que la proliferación celular era suficiente para realizar los experimentos. Las células de LLC se ajustaron a concentraciones de  $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se inocularon a ratones C57BL6 macho de seis semanas de edad adquiridos de *Charles River Japan, Inc.* (Tokio, Japón) y *Clea Japan, Inc.* (Tokio, Japón) por vía subcutánea ( $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l/ratón) en el hipocondrio derecho. Los ratones se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos, y se les proporcionó comida y agua estéril. Cuando los tumores transplantados crecieron hasta aproximadamente 100 mm<sup>3</sup> de volumen del tumor, los animales se dividieron en cuatro grupos iguales (Grupo de control, n = 6; C, grupo de donador de NO, n = 6; N, Grupo de quimioterapia, n = 6; CTX, y grupo de NO más quimioterapia, n = 6; N+CTX). El volumen del tumor se calculó como  $0,5 \times \{\text{longitud del tumor (mm)}\} \times \{\text{anchura del tumor (mm)}\}^2$ . En el grupo de control, se administraron 100  $\mu$ l de PBS mediante inyección intraperitoneal (i.p.) cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l más de PBS mediante inyección intravenosa (i.v.) 30 minutos después de la i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves) a los ratones C57BL6. Los experimentos se realizaron durante dos semanas. En el grupo de donador de NO, se administraron 100  $\mu$ l de 0,02 mg/kg de nitroglicerina diluida con PBS i.p. a los ratones cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l de PBS i.v. a los ratones 30 minutos después de la solución de nitroglicerina i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves). Los experimentos se realizaron durante dos semanas. En el grupo de quimioterapia, se administraron 100  $\mu$ l de PBS i.p. a los ratones cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l de 3,5 mg/kg de solución de cisplatino disuelto en PBS i.v. a los ratones, 30 minutos después del PBS i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves). Los experimentos se realizaron durante dos semanas. En el grupo de NO más quimioterapia, se administraron 100  $\mu$ l de 0,02 mg/kg de nitroglicerina diluida con PBS i.p. a los ratones cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l de 3,5 mg/kg de solución de cisplatino disuelto en PBS i.v. a los ratones, 30 minutos después de la solución de nitroglicerina i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves). Los experimentos se realizaron durante dos semanas. El cisplatino y la nitroglicerina se obtuvieron de *Nippon Kayaku Co., Ltd* (Tokio, Japón). Se realizaron mediciones de volumen del tumor murino y peso corporal de los ratones cada dos días después del inicio de las inyecciones a los ratones.

*Resultados*

La curva de crecimiento del volumen del tumor se muestra en la figura 2. Se observó una disminución significativa del volumen del tumor murino después del día 9 en el grupo de NO más quimioterapia en comparación con el del grupo de quimioterapia. Por otro lado, el grupo del donador de NO así como el grupo de control mostraban un rápido crecimiento tumoral en comparación con el del grupo de quimioterapia y el del grupo de NO más quimioterapia. Estos datos sugieren que la posibilidad de un nuevo uso comercial de donadores de NO como agente potenciador para el efecto de agentes antineoplásicos puede aumentar debido a su excelente efecto sobre la mejora de la quimiosensibilidad, especialmente en cánceres sólidos difíciles de tratar con quimioterapia.

## Ejemplo 3

*El uso concomitante de un donador de NO, nitroglicerina, mejora la quimiosensibilidad en un modelo de cáncer de colon murino*

55 *Métodos*

Células de colon 26, células de cáncer de colon murino, se obtuvieron del *Tohoku University Cell Resource Center for Biomedical Research* y se incubaron con RPMI 1640 más suero fetal bovino al 10% hasta que la proliferación celular era suficiente para realizar los experimentos. Las células de colon 26 se ajustaron a concentraciones de  $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se inocularon a ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad adquiridos de *Charles River Japan, Inc.* (Tokio, Japón) y *Clea Japan, Inc.* (Tokio, Japón) por vía subcutánea ( $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ l/ratón) en el hipocondrio derecho. Los ratones se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos, y se les proporcionó comida y agua estéril. Cuando los tumores transplantados crecieron hasta aproximadamente 100 mm<sup>3</sup> de volumen del tumor, los animales se dividieron en cuatro grupos iguales (Grupo de control, n = 6; C, Grupo de donador de NO, n = 6; N, Grupo de quimioterapia, n = 6; CTX, y grupo de NO más quimioterapia, n = 6; N+CTX). El volumen del tumor se calculó como  $0,5 \times \{\text{longitud del tumor (mm)}\} \times \{\text{anchura del tumor (mm)}\}^2$ . En el grupo de control, se administraron 100  $\mu$ l de PBS mediante inyección intraperitoneal (i.p.) cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron

100  $\mu$ l más de PBS mediante inyección intravenosa (i.v.), 30 minutos después de la i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves) a los ratones BALB/c. Los experimentos se realizaron durante dos semanas. En el grupo de donador de NO, se administraron 100  $\mu$ l de 0,02 mg/kg de nitroglicerina diluida con PBS i.p. a los ratones cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l de PBS i.v. a los ratones, 30 minutos después de la solución de nitroglicerina i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves). Los experimentos se realizaron durante dos semanas. En el grupo de quimioterapia, se administraron 100  $\mu$ l de PBS i.p. a los ratones cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l de 3,5 mg/kg de solución de cisplatino disuelto en PBS i.v. a los ratones, 30 minutos después del PBS i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves). Los experimentos se realizaron durante dos semanas. En el grupo de NO más quimioterapia, se administraron 100  $\mu$ l de 0,02 mg/kg de nitroglicerina diluida con PBS i.p. a los ratones cuatro veces a la semana (una vez el domingo, una vez el lunes, una vez el miércoles, una vez el jueves) y se administraron 100  $\mu$ l de 3,5 mg/kg de solución de cisplatino disuelto en PBS i.v. a los ratones, 30 minutos después de la solución de nitroglicerina i.p. dos veces a la semana (una vez el lunes y una vez el jueves). Los experimentos se realizaron durante dos semanas. El cisplatino y la nitroglicerina se obtuvieron de *Nippon Kayaku Co., Ltd.* (Tokio, Japón). Se realizaron mediciones de volumen del tumor murino y peso corporal de los ratones cada dos días después del inicio de las inyecciones a los ratones.

#### *Resultados*

La curva de crecimiento del volumen del tumor se muestra en la figura 3. Se observó una disminución significativa del volumen del tumor murino después del día 6 en el grupo de NO más quimioterapia en comparación con el del grupo de quimioterapia. Por otro lado, el grupo del donador de NO así como el grupo de control mostraban un rápido crecimiento tumoral en comparación con el del grupo de quimioterapia y el del grupo de NO más quimioterapia.

Estos datos sugieren que el uso de donadores de NO combinados con agentes antineoplásicos puede aumentar la posibilidad de un nuevo uso comercial de donadores de NO, debido a su excelente efecto sobre la mejora de la quimiosensibilidad no solamente en cáncer de pulmón sino también en cáncer de colon.

#### **Aplicabilidad industrial**

La presente invención es capaz de proporcionar un agente potenciador para el efecto de un agente antineoplásico para conseguir un efecto terapéutico excelente sobre el cáncer, con lo cual tiene una aplicabilidad industrial.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de nitrato orgánico como donador de óxido nítrico para la fabricación de un agente  
5 potenciador para el efecto de un agente antineoplásico,

**caracterizado** porque el cáncer que es objeto del tratamiento es un cáncer sólido y

porque el cáncer sólido es cáncer de pulmón macrocítico o cáncer de colon.

10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el cáncer de pulmón macrocítico es adenocarcinoma.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

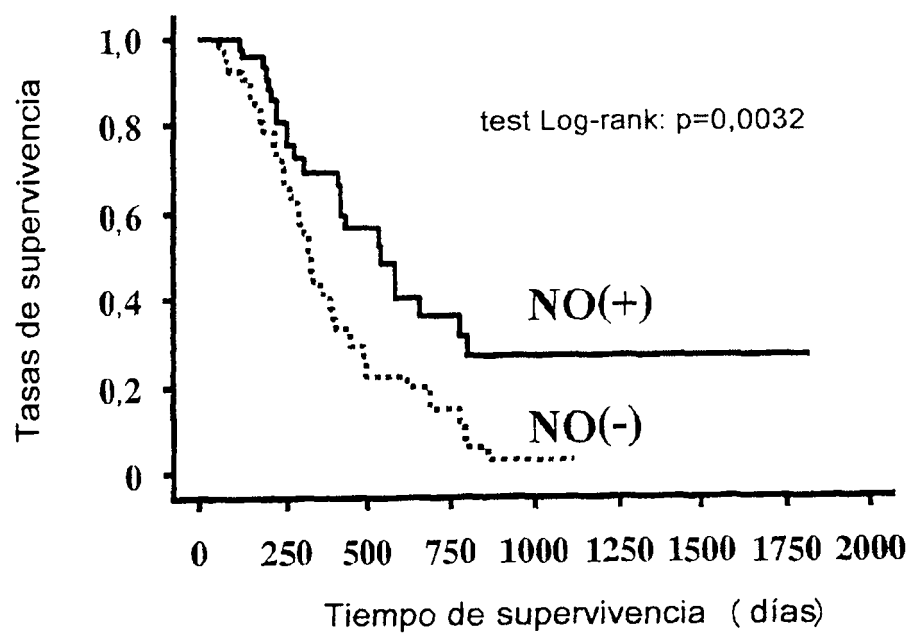
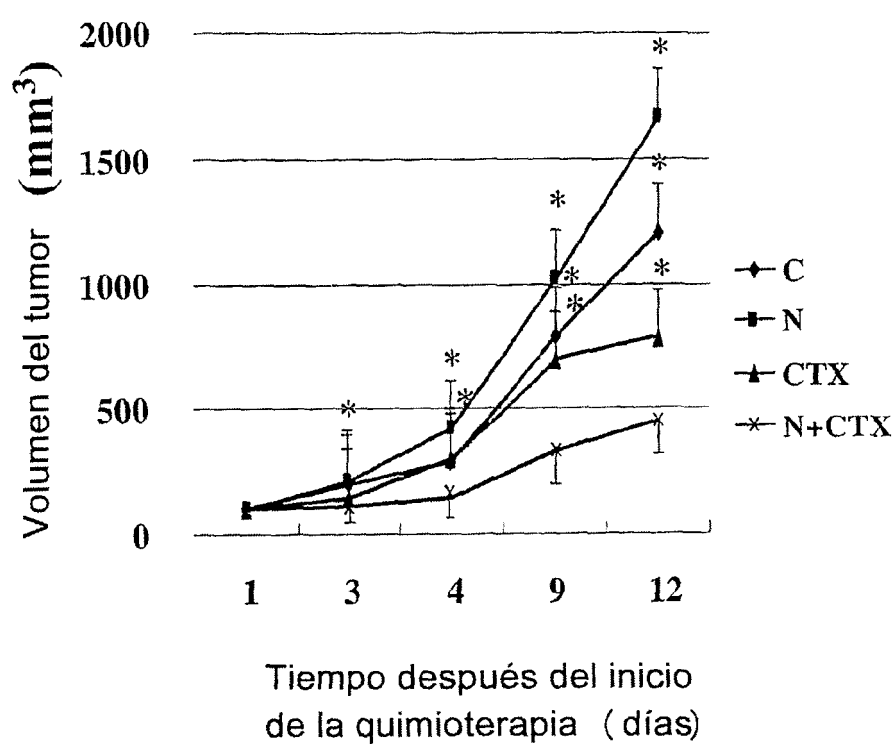
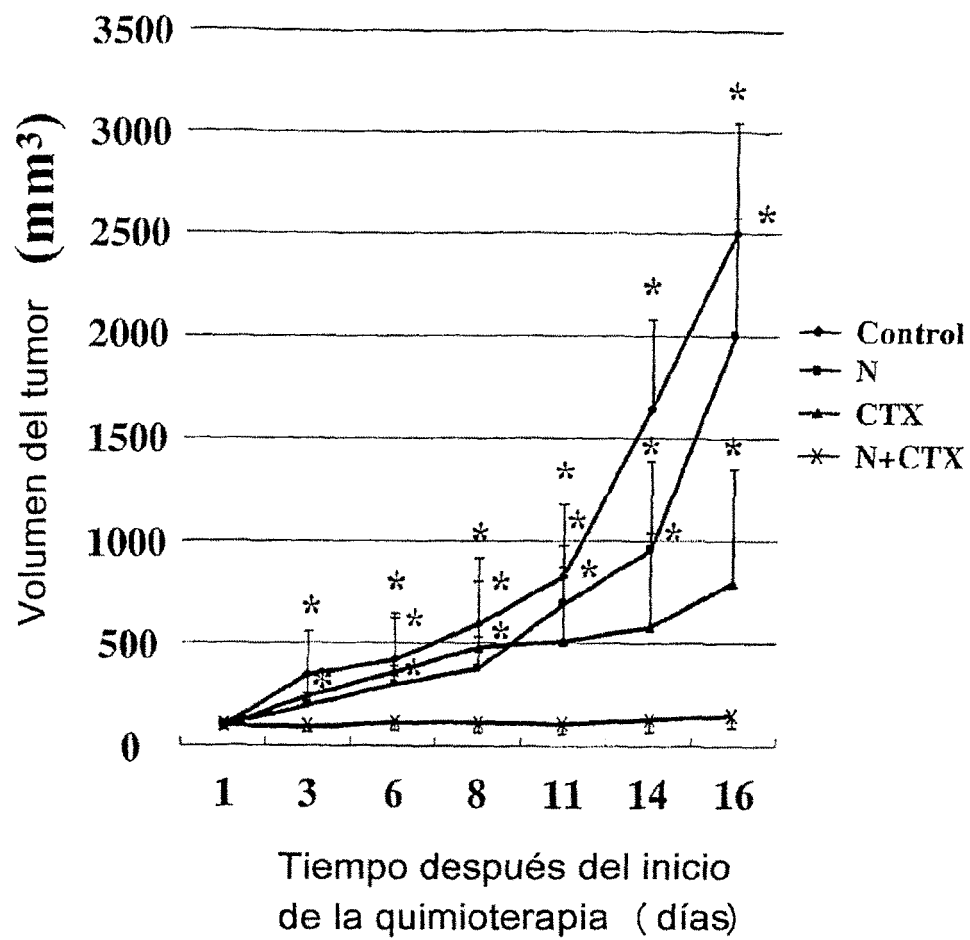


Figura 2.



\* $p < 0,05$  vs N+CTX

Figura 3.



\* $p < 0,05$  vs N+CTX