



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 345 587**

② Número de solicitud: 200802800

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 31/357** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.10.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **27.09.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**27.09.2010**

⑰ Solicitante/s: **Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) c/ Melchor Fernández Almagro, 3 28029 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Mateo de Castro, Jesús y García Maceira, Patricia**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Composición que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt para el tratamiento del cáncer.**

㉖ Resumen:

Composición que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt para el tratamiento del cáncer.

Uso de una composición que comprende silibinin y un inhibidor de Akt para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, y preparación combinada de, al menos, silibinin y un inhibidor de la ruta PI3K/Akt para su uso por separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento del cáncer.

ES 2 345 587 A1

## DESCRIPCIÓN

Composición que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt para el tratamiento del cáncer.

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, y refiere a una composición que comprende silibinin y un inhibidor de Akt para el tratamiento del cáncer.

## Estado de la técnica anterior

- 10 La hipoxia es una característica común de la mayoría de los tumores sólidos. A medida que las células tumorales proliferan, la demanda de nutrientes y oxígeno crece hasta el punto en el que la difusión de oxígeno desde los vasos sanguíneos se hace limitante, dando lugar a hipoxia. Las células cancerígenas se adaptan a este ambiente hipóxico a través de la activación de un número de vías celulares que estimulan la glicólisis, la proliferación, la sobre-regulación de numerosos factores de supervivencia, y la neovascularización (angiogénesis). Estos procesos proveen al tumor de energía suficiente y de suplemento de sangre para permitir el crecimiento bajo condiciones de hipoxia.

- El principal regulador transcripcional de la respuesta a hipoxia es el HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), que juega un papel central en el crecimiento tumoral y en la angiogénesis. HIF-1 es un factor transcripcional heterodimérico formado por las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  se expresa constitutivamente y sus niveles no son afectados por cambios en la pO<sub>2</sub>. Por el contrario, HIF-1 $\alpha$  es degradado rápida y continuamente por el sistema ubiquitin-proteasoma tras su unión a la proteína de von Hippel-Lindau (pVHL), en un proceso que depende de la hidroxilación de los residuos de prolina 402 y 564 por una familia de enzimas conocidas como proli-4-hidroxilasas que son dependientes de O<sub>2</sub>, hierro y oxoglutarato. Bajo condiciones de hipoxia, la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  está inhibida, lo que conduce a un incremento de la estabilidad de HIF-1 $\alpha$ . Aunque la inhibición de las proli-4-hidroxilasas en hipoxia es reconocido como el mecanismo primario de la acumulación de HIF-1 $\alpha$ , se hace evidente que la expresión de HIF-1 $\alpha$  también depende de su tasa de síntesis de *novo*. Algunos factores de crecimiento, citoquinas, y otras moléculas señalizadoras pueden estimular la síntesis de proteína de HIF-1  $\alpha$  a través de la activación de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*). mTOR regula la traducción de proteínas a través del incremento de la fosforilación de sus efectores p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) y rpS6 (*ribosomal protein S6*), lo que da lugar al incremento de la traducción de mRNAs que contienen secuencias 5'-terminal TOP (*oligopyrimidine tract*) en sus 5'-UTR. mTOR también fosforila el factor 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein-1*), que resulta en la activación de eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) e induce la traducción cap-dependiente. Datos recientes sugieren que la actividad de mTOR es necesaria para la expresión de HIF-1 $\alpha$  independientemente de las condiciones de oxigenación celular.

- El silibinin es un flavonoide antioxidante aislado de *Silybum marianum* L. Gaertn., que se usa en clínica por sus propiedades hepatoprotectivas y como agente antihepatotóxico para el tratamiento de varias enfermedades hepáticas, vendiéndose también como un suplemento dietético. Recientemente, se han comprobado sus efectos preventivos, anti-proliferativos y pro-apoptóticos en varias células cancerosas, fundamentalmente en el cáncer de piel, mama, pulmón, colon, páncreas y próstata. Se han propuesto varios mecanismos de acción de silibinin, como la inhibición de la síntesis de ADN, del crecimiento celular por arresto en la fase G0/G1 ó G2, o mediante un incremento moderado de la expresión de IGFBP-3 (*insulin-like growth factorbinding protein-3*), lo que puede tener un efecto inhibitorio en la acción mitogénica de IGF-1. Estudios recientes parecen demostrar que el silibinin inhibe la angiogénesis a través de la regulación a la baja de la vía Akt y NF- $\kappa$ B (Mallikarjuna *et al.*, 2004. *Cancer Res.* 64: 6349-6356). Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el que el silibinin ejerce sus efectos antitumorales.

- Datos recientes han mostrado que la proteína quinasa mTOR puede formar dos complejos multiproteicos que regulan diferentes aspectos de la señalización de mTOR: el Complejo mTOR 1 (mTORC1) y el Complejo mTOR 2 (mTORC2).

- El complejo mTORC1 se compone de mTOR, raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), y mLST8, y regula el crecimiento y la proliferación celular modulando procesos tales como la biogénesis ribosomal y la traducción de proteínas a través de sus efectores p70S6K, rpS6 y 4E-BP1. Notablemente, además de su papel en promover la traducción de proteínas, se ha visto que p70S6K reprime la vía PI3K/Akt inhibiendo la expresión IRS1 (*insulin receptor substrate-1*) e IRS2 (Manning 2004. *J Cell Biol* 167:399-403).

- El complejo mTORC2 contiene mTOR, rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), mLST8, y mSin1 (Guertin & Sabatini 2007. *Cancer Cell* 12:9-22), y trabajos recientes han demostrado que mTORC2 induce la actividad de Akt mediante la fosforilación directa de la Ser<sup>473</sup> (Sarbasov *et al.*, 2005. *Science* 307:1098-10101).

- Así pues, la activación de la vía mTORC1 suprimiría la señalización de PI3K/Akt, mientras que la inhibición mTORC1 activaría Akt mediante el *feed-back* negativo producido por p70S6K. Se acepta que la rapamicina y sus análogos son inhibidores universales de mTORC1 (y de p70S6K), mientras que son inhibidores de mTORC2 dependiendo del tipo celular, y así de Akt (Sabatini 2006. *Nat Rev Cáncer* 6:729-734).

- En base a este mecanismo, las células tumorales en las que la inhibición de mTOR da lugar a la desactivación de Akt serían aquellas en las que se expresa un complejo mTORC2 sensible a rapamicina, mientras que las células en las que Akt es activado o no afectado por los inhibidores de mTOR podrían ser aquellas que expresan un complejo

mTORC2 insensible a rapamicina, como se ha demostrado en las células HeLa (Sarbasov *et al.*, 2006. *Mol Cell* 22:159-68).

### Descripción de la invención

5

La presente invención proporciona un tratamiento útil para el cáncer, especialmente para aquellos tipos de cáncer en los que el silibinin activa indirectamente la vía PI3K/Akt, mediante la administración de silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt.

10

Los autores de la presente invención han demostrado que silibinin inhibe la acumulación de HIF-1 $\alpha$  inducida por hipoxia en varias líneas celulares. Asimismo, los autores describen que silibinin reprime la actividad de mTOR y de sus efectores p70S6K, rpS6 y 4E-BP1, incrementando la fosforilación de Akt, y que el empleo combinado de silibinin con inhibidores de la vía PI3K/Akt tiene un efecto sinérgico en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, al impedir la activación de PI3K/Akt que produce silibinin en determinados tipos de células.

15

De esta manera, composiciones farmacéuticas que comprendan el silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt son más útiles en aquellos tipos de cáncer en los que silibinin produce una activación de la vía PI3K/Akt.

20

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención como medicamento.

25

El Silibinin (*INN International Nonproprietary Name*), también conocido como silibin, es el constituyente activo principal del silimarín, la mezcla de flavolignanos extraídos del *Silybum marianum*. Tienen como fórmula química IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) 3,5,7-trihidroxi-2-(3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-2,3 dihidrobenzo[b] [1,4]dioxin-6-il)croman-4-ona. Por silibinin, en esta memoria, se entiende tanto el silibinin en sí como cualquiera de sus derivados, sales, profármacos, o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

30

La vía PI3K/Akt ha sido ampliamente estudiada y ha sido reconocida como una diana prometedoras para las terapias anticancerígenas puesto que su activación es un evento celular clave durante la tumorigénesis. Una vez que las quinasas PI3K y Akt se han activado bajo el estrés apoptótico, se traducen señales a una serie de reguladores vías abajo. Entre los inhibidores de PI3K se encuentran el LY294002 (CAS 154447-36-6) y el Wortmannin (CAS 19545-26-7), y entre los inhibidores de Akt, el Triciribine (API-2, NSC-154020, TCN, Akt inhibidor V; CAS 35943-35-2), A-443654 (*imidazole-pyridine based*), KP372-1, Akt Inhibitor II (SH-5), Akt Inhibitor III (SH-6), Akt Inhibitor IV (CAS 681281-88-9), Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2 (sal hidratada de trifluoroacetato de 1,3-Dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona), Akt Inhibitor X (CAS 925681-41-0).

35

40

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de Akt se selecciona de la lista que comprende: LY294002, Wortmannin, Triciribine (API-2, NSC-154020, TCN, Akt inhibidor V), A-443654 (*imidazole-pyridine based*), KP372-1, Akt Inhibitor II (SH-5), Akt Inhibitor III (SH-6), Akt Inhibitor IV, Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2, Akt Inhibitor X. En una realización particular de este aspecto de la invención, el inhibidor de la vía PI3K/Akt es el LY294002.

45

En la composición de la invención el silibinin tiene un efecto inhibidor de mTOR, útil en el tratamiento del cáncer, y a la vez los inhibidores de la activación de la vía PI3K/Akt son útiles en aquellos tipos de cáncer en los que el silibinin, al igual que otros inhibidores de mTOR, activan dicha vía. Tal y como se demuestra en los ejemplos, el empleo combinado del silibinin con el inhibidor de la vía PI3K/Akt empleado (LY294002) da lugar a un efecto sinérgico en determinadas líneas celulares tumorales.

50

Así pues, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

55

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los tipos de cáncer se seleccionan de la lista que comprende: cáncer cervical, cáncer gastrointestinal o cáncer hepático. En una realización particular de este aspecto de la invención, el cáncer es cáncer cervical.

60

Otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada de, al menos, silibinin y un inhibidor de la ruta PI3K/Akt, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, para su uso por separado, simultáneo ó secuencial en el tratamiento del cáncer.

65

Los autores de la presente invención han demostrado que el silibinin actúa como anticancerígeno inhibiendo mTOR, y puesto que la función de mTOR y su regulación por la vía PI3K/Akt es tumor específica, el tratamiento del cáncer con silibinin, en ocasiones, activa la vía PI3K/Akt. La activación de la vía PI3K/Akt es necesaria para la diferenciación celular, y probablemente tiene una gran relevancia a nivel fisiológico, puesto que acopla procesos vitales como son la diferenciación y la supervivencia celular.

## ES 2 345 587 A1

Por tanto, la combinación del silibinin con un inhibidor de la vía PI3K/Akt incrementa sinérgicamente la respuesta, como se muestra en los ejemplos de la invención, no representando un mero agregado de agentes conocidos, sino una nueva combinación que proporciona un nuevo tratamiento efectivo frente al cáncer.

5 El silibinin y el inhibidor de PI3K/Akt podrían administrarse a un paciente por separado, de manera simultánea o secuencialmente, dependiendo de la pauta de administración más adecuada a cada caso. Dicha preparación combinada de silibinin y un inhibidor de la ruta PI3K/Akt por separado, de manera simultánea o secuencial sería útil en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

10 Debe enfatizarse que el término “preparación combinada” o también denominada “yuxtaposición”, en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición, para poder encontrarse disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

15 Una realización preferida de este aspecto de la invención, la preparación combinada de la invención se usa para el tratamiento de una serie de cánceres que se seleccionan de la lista que comprende: cáncer cervical, cáncer gastrointestinal y cáncer hepático. En una realización particular, el cáncer es cáncer cervical.

20 En los ejemplos de la presente invención se recoge como, mientras que la activación de Akt en la línea celular HeLa aumenta con la dosis de silibinin administrada, en determinadas líneas celulares (AGS y Hep3B) concentraciones de silibinin superiores a 250  $\mu\text{M}$  pueden inhibir la activación de la vía Akt, y en otras líneas celulares (PC-3) no se produce nunca la activación de Akt. Además, se ve como en todas las líneas celulares ensayadas, la inhibición de la producción de VEGF es mayor a concentraciones de silibinin superiores a 250  $\mu\text{M}$  y aún mayor a 500  $\mu\text{M}$ . Y aún más, cuando se ha ensayado la inhibición de la proliferación celular se ha visto que en todos los casos la proliferación se inhibe desde concentraciones bajas, pero en el caso de las líneas celulares de cáncer cervical y gástrico, la inhibición de la proliferación es notablemente mayor a concentraciones superiores a 250  $\mu\text{M}$ .

25 Por tanto, el tratamiento con silibinin en la mayoría de los tipos de cáncer (a excepción del cáncer de próstata) será más efectivo si se administra al paciente dosis elevadas del mismo, que permitan alcanzar concentraciones en las células superiores a 250  $\mu\text{M}$ , y más aún preferiblemente, de 500  $\mu\text{M}$ .

30 Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del silibinin en la proporción necesaria para alcanzar concentraciones celulares superiores a 250  $\mu\text{M}$ , para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer se selecciona de la lista que comprende: cáncer cervical, cáncer gastrointestinal y cáncer hepático. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el silibinin se encuentra en proporciones que permiten alcanzar concentraciones celulares superiores a 500  $\mu\text{M}$ .

35 La proporción de silibinin necesaria para alcanzar dichas concentraciones celulares dependerá de la formulación del medicamento, de los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptados que permitan una liberación adecuada del silibinin. Métodos de formulación adecuados son conocidos en el estado de la técnica.

40 En esta memoria se entiende por “cáncer” un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas (también conocidas como cancerígenas o cancerosas), con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado (crecimiento y división más allá de los límites normales, invasión del tejido circundante y, a veces, metástasis). Comprende cualquier enfermedad de un órgano o tejido en un mamífero, preferiblemente el hombre, caracterizado por una multiplicación pobremente controlada, o descontrolada, de células normales o anormales en dicho tejido, y su efecto en la totalidad del cuerpo. El término cáncer, dentro de esta definición, incluye las neoplasias benignas, displasias, hiperplasias, así como neoplasias que muestran metástasis, o cualquier otra transformación como por ejemplo, leucoplasias que a menudo preceden al brote del cáncer. Las células y los tejidos son cancerosos cuando crecen y se replican más rápidamente de lo normal, desplazándose o dispersándose en el tejido sano circundante o cualquier otro tejido del cuerpo, lo que se conoce como metástasis, asume formas y tamaños anormales, muestra cambios en su ratio nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, y finalmente cesa. Células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como un todo causando síndromes paraneoplásicos, o sí el cáncer ocurre en un órgano o tejido vital, siendo interrumpida o dañada su función normal, con posibles resultados fatales. El resultado final de la evolución de un cáncer que involucra un órgano vital, ya sea primario o metastático, es la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a extenderse, y su grado de extensión se relaciona normalmente con cambios en la supervivencia a la enfermedad.

45 Generalmente se dice que el cáncer se encuentra en uno de tres estados de crecimiento: temprano o localizado, cuando el tumor aún se encuentra confinado en el tejido de origen, o en su localización primaria; extensión directa, cuando las células cancerígenas del tumor han invadido el tejido adyacente o se ha extendido únicamente a los nódulos linfáticos regionales; o metástasis, cuando las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde la localización primaria, por medio del sistema circulatorio o linfático, y se ha establecido en localizaciones secundarias.

60 Se dice que un cáncer es maligno por su tendencia a causar la muerte si no es tratado. Los tumores benignos, usualmente no causan la muerte, aunque pueden hacerlo si interfieren con la función normal del cuerpo por sus características o localización, tamaño o efectos paraneoplásicos. Aquí los tumores malignos caen dentro de la definición de

## ES 2 345 587 A1

cáncer dentro del ámbito de esta definición también. En general, las células cancerosas se dividen a una tasa mayor que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de los tejidos cancerosos y normales no es tanto que la división celular sea mucho más rápida, como la pérdida parcial o completa de detener su crecimiento y de diferenciarse en un tejido útil y limitado, del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento del tejido normal. El tejido canceroso puede expresar ciertas moléculas receptoras y probablemente están influenciadas por la susceptibilidad e inmunidad, y se sabe que ciertos cánceres de la próstata y de mama, por ejemplo, dependen de ciertas hormonas. El término "cáncer" en esta memoria, no se limita simplemente a neoplasias benignas, sino que comprende también otras neoplasias benignas o malignas como: 1) Carcinoma, 2) Sarcoma, 3) Carcinosarcoma, 4) Cánceres de los tejidos formadores de sangre, 5) tumores de tejidos nerviosos, incluyendo el cerebro, 6) cáncer de células de la piel.

El carcinosarcoma ocurre en los tejidos epiteliales, que cubren la cara externa del cuerpo (la piel) y las membranas mucosas y la cavidad interna de la estructura de los órganos, tales como las mamas, el pulmón, el tracto digestivo y gastrointestinal, las glándulas endocrinas, y el sistema genitourinario. Los elementos ductales o glandulares pueden persistir en los tumores epiteliales, así como en los adenocarcinomas, como por ejemplo, el adenocarcinoma de tiroides, el adenocarcinoma gástrico, el adenocarcinoma uterino. Cánceres del epitelio de células pavimentadas de la piel y de ciertas membranas mucosas, como por ejemplo, cáncer de lengua, labios, laringe, vejiga urinaria, cerviz uterina, o pene, puede ser denominado carcinoma epidermoide o de células escuamosas de los tejidos respectivos, y se encuentran también dentro de la definición de cáncer en esta memoria.

El sarcoma se desarrolla en los tejidos conectivos, incluyendo el tejido fibroso, adiposo, el músculo, los vasos sanguíneos, hueso, y el cartílago como por ejemplo el sarcoma osteogénico, liposarcoma, fibrosarcoma, y el sarcoma sinovial.

Los carcinosarcomas se desarrollan tanto en el tejido epitelial como en el conectivo. El cáncer puede ser primario o secundario. Primario indica que el cáncer se ha originado en el tejido que se ha encontrado, en lugar de haberse establecido tras metástasis desde otra región.

El cáncer y las enfermedades tumorales, pueden ser también benignos o malignos, y pueden afectar a las estructuras anatómicas del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo, pero sin limitarnos, pueden ser:

I) cáncer y enfermedades tumorales de la médula ósea, y de células derivadas de la médula ósea (leucemias),

II) glándulas endocrinas y exocrinas, como por ejemplo, tiroides, paratiroides, pituitaria, glándulas adrenales, glándulas salivares, páncreas.

III) de mama, como por ejemplo, tumores benignos y malignos en las glándulas mamarias tanto de hombres como de mujeres, los conductos mamarios, adenocarcinoma, carcinoma medular, comedo carcinoma. La enfermedad de Paget del pezón, el carcinoma inflamatorio de mujeres jóvenes,...

IV) El pulmón,

V) El estómago,

VI) El hígado y el bazo,

VII) El intestino delgado,

VIII) El colon,

IX) El hueso, y sus tejidos conectivos y de soporte, como el tumor de huesos maligno o benigno, por ejemplo, el sarcoma osteogénico maligno, el osteoma benigno, los tumores de cartílago; como el condrosarcoma maligno o el condroma benigno; tumores de la médula ósea, como el mieloma maligno, o el granuloma eosinofílico benigno, así como tumores metastáticos de los tejidos óseos en otras localizaciones del cuerpo,

X) la boca, cuello, laringe, y el esófago,

XI) La vejiga urinaria y los órganos y estructuras internas y externas del sistema urogenital masculino y femenino, como ovario, útero, cerviz del útero, testículos y glándula prostática,

XII) La próstata,

XIII) El páncreas, como el carcinoma ductal del páncreas,

XIV) El tejido linfático como linfomas y otros tumores de origen linfoide,

XV) La piel,

XVI) Cáncer y enfermedades tumorales de todas las estructuras anatómicas pertenecientes al sistema respiratorio, incluyendo los músculos torácicos y la pleura,

XVII) cáncer primario y secundario de los nódulos linfáticos,

XVIII) La lengua y las estructuras óseas del paladar y de los senos,

XIX) La boca, pómulos, cuello y glándulas salivares,

XX) Los vasos sanguíneos incluyendo el corazón y sus membranas,

XXI) El músculo liso o esquelético, incluyendo sus ligamentos y membranas,

XXII) El sistema nervioso periférico, autónomo y central, incluyendo el cerebelo,

XXIII) El tejido adiposo.

Tanto las composiciones de la presente invención como la preparación combinada pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de silibinin, profármacos, derivados o análogos del silibinin que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Fig. 1. *Silibinin inhibe la acumulación de la proteína HIF-1 $\alpha$  inducida por hipoxia y la activación transcripcional de HIF-1.* A. Las células tumorales HeLa y Hep3B fueron expuestas a condiciones hipóxicas (2% de O<sub>2</sub>) por los tiempos indicados en ausencia o presencia de silibinin (Sili, 500  $\mu$ mol/L). Los niveles de proteína de HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  y actina fueron detectados por inmunoblot a partir de los extractos celulares totales según lo descrito en materiales y métodos. B. Las células Hep3B fueron tratadas durante 4 h en normoxia (21% de O<sub>2</sub>, carril 1), hipoxia (2% de O<sub>2</sub>), o con el agente hipoxia-mimético DMOG (1 mmol/L) en presencia de silibinin en las concentraciones indicadas, o con el vehículo (0). Las proteínas fueron detectadas por inmunoblot. C. Células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido reportero p9HIF1-Luc y después fueron incubadas durante 8 h de manera similar a lo descrito en B. La actividad transcripcional de HIF-1 fue ensayada midiendo la respuesta a la hipoxia dependiente de la expresión del gen reportero según se describe en materiales y métodos. Los experimentos fueron realizados por duplicado y los resultados mostrados son representativos de tres análisis independientes. Las barras representan la media  $\pm$  SE. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, comparado con sus controles respectivos sin silibinin. D. Células HeLa fueron expuestas a los niveles indicados de hipoxia ([O<sub>2</sub>], 6, 3, 1 y 0.1%) durante 4 h en ausencia o presencia de silibinin (Sili, 500  $\mu$ mol/L). Los niveles de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y actina fueron detectados por inmunoblot como en A.

Fig. 2. *Silibinin no afecta a la degradación de la proteína de HIF-1 $\alpha$  o a la expresión del mRNA de HIF-1 $\alpha$ .* A. Células HeLa fueron expuestas a hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) durante 2 h, y silibinin (500  $\mu$ mol/L) o el vehículo (control) fueron agregados 15 min antes del final de la incubación hipóxica. Las células fueron entonces expuestas a normoxia

(reoxigenación) por los períodos indicados, y los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  fueron medidos por inmunoblot. El panel inferior muestra la cuantificación densitométrica de los niveles de HIF-1 $\alpha$ , con los valores expresados como el porcentaje de la expresión antes de la reoxigenación (tiempo 0). Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro experimentos independientes. B, Células CHO Ka13.5 deficientes en HIF-1 $\alpha$  fueron transfectadas con el tipo salvaje HIF-1 $\alpha$ , el mutante P402A/P564A-HIF-1 $\alpha$  o con el vector vacío como se describe en Materiales y Métodos. Después de 24 h, las células fueron expuestas a normoxia o a hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) durante 4 h en presencia de las concentraciones indicadas de silibinin (Sili), y el HIF-1 $\alpha$  recombinante fue detectado por inmunoblot. C, Células HeLa fueron cultivadas bajo condiciones normóxicas (21% de O<sub>2</sub>) o hipóxicas (2% de O<sub>2</sub>) en ausencia o presencia de silibinin (500  $\mu$ mol/L) por los tiempos indicados. El ARN total fue aislado y analizado para la expresión del mRNA de HIF-1 $\alpha$  por RT-PCR, usando GAPDH como gen control. D, Panel superior, las células HeLa fueron incubadas durante 2 h bajo condiciones normóxicas (21% de O<sub>2</sub>) o hipóxicas (2% de O<sub>2</sub>). A continuación, las células fueron tratadas durante una hora adicional bajo las mismas atmósferas en presencia de MG132 (20  $\mu$ mol/L), ciclohexamida (CHX, 100  $\mu$ mol/L) o silibinin (500  $\mu$ mol/L), seguido por análisis mediante inmunoblot. Panel inferior, las células HeLa fueron incubadas durante 3 h en hipoxia (2% de O<sub>2</sub>). Posteriormente, las células fueron tratadas en hipoxia por los tiempos adicionales indicados con el vehículo (control), CHX (100  $\mu$ mol/L) o silibinin (500  $\mu$ mol/L), y HIF-1 $\alpha$  fue detectado por inmunoblot.

Fig. 3. *Silibinin inhibe la señalización de mTOR y aumenta la fosforilación de Akt en células cancerosas HeLa y Hep3B.* A, Las células fueron incubadas en hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) durante 3 h en presencia de las concentraciones indicadas de silibinin (Sili). El carril 1 de cada panel muestra los niveles basales en normoxia de las proteínas bajo estudio. B, Células HeLa fueron incubadas durante 4 h en normoxia (21% de O<sub>2</sub>) o hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) en presencia de silibinin (500  $\mu$ mol/L), LY294002 (LY, 10  $\mu$ mol/L), o rapamicina (Rapa, 20 nmol/L) según se indica. C, Células Hep3B fueron incubadas como en B, y tratadas con las concentraciones indicadas de silibinin (Sili) en ausencia o presencia de LY294002 (LY, 10  $\mu$ mol/L). Las proteínas en A-C fueron detectadas por inmunoblot usando los anticuerpos específicos descritos en Materiales y Métodos.

Fig. 4. *Los efectos de silibinin sobre la vía mTOR, la activación de Akt y la acumulación de HIF-1 $\alpha$  son rápidos y completamente reversibles.* Las células HeLa y Hep3B fueron expuestas a hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) por 3 h, y silibinin (Sili, 500  $\mu$ mol/L) fue añadido durante los últimos 0 (no tratadas), 10, 20, 30 ó 60 minutos de incubación hipóxica. Los carriles 7 y 8 de cada panel representan las células tratadas con silibinin durante los últimos 60 min de incubación hipóxica, seguidas por dos lavados del medio extracelular para eliminar el silibinin, y la incubación por un periodo adicional de 30 ó 60 min bajo hipoxia para estudiar la reversibilidad de los efectos. El carril 1 de cada panel muestra los niveles basales en normoxia de las proteínas analizadas, que fueron detectadas por inmunoblot.

Fig. 5. *Silibinin inhibe la liberación de VEGF inducida por hipoxia en células tumorales HeLa y Hep3B.* A, Las células fueron incubadas durante 12 h en normoxia o hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) en presencia de la concentración indicada de silibinin, y el medio extracelular fue recuperado para la determinación de VEGF por ELISA según lo descrito en Materiales y Métodos. Los valores representan la media  $\pm$  SE a partir de tres experimentos independientes. \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001, significativamente diferente comparado con las células control en hipoxia sin silibinin. B, VEGF fue determinado en células HeLa tratadas durante 12 h con las drogas y las condiciones indicadas de oxígeno; Hipoxia (2% de O<sub>2</sub>), Silibinin250 (250  $\mu$ mol/L), Silibinin500 (500  $\mu$ mol/L), LY294002 (LY, 10  $\mu$ mol/L), rapamicina (Rapa, 20 nmol/L). El gráfico es representativo de tres experimentos con resultados similares. Las barras representan la media  $\pm$  SE. \*, P<0.05, \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001, significativamente diferente comparado con las células control en hipoxia sin silibinin. #, P<0.01, comparado con el tratamiento Silibinin<sub>250</sub>.

Fig. 6. *Efecto del silibinin sobre la proliferación y la apoptosis de las células tumorales HeLa y Hep3B.* A, Las células fueron incubadas en hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) con concentraciones crecientes de silibinin (0, 50, 100, 250 o 500  $\mu$ mol/L) por los tiempos indicados. Las células viables fueron cuantificadas fluorimétricamente mediante la conversión de resazurin a resorufin, como se describe en Materiales y Métodos. B, Las células fueron incubadas durante 8 h como en A, y la apoptosis fue cuantificada midiendo las actividades de caspase-3 y -7 con un análisis luminescente, usando staurosporina como control positivo (Staur, 500 nmol/L). Las barras representan la media  $\pm$  SE. \*, P<0.05, \*\*, P<0.01, \*\*\*, P<0.001, significativamente diferentes comparadas con el control no tratado a cada tiempo.

Fig. 7. *Efecto de silibinin sobre la señalización de mTOR y la fosforilación de Akt en la línea celular AGS de cáncer gastrointestinal.* Las células AGS fueron cultivadas en hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) durante 3 h en presencia de las concentraciones indicadas de silibinin (Sili). El carril 1 muestra los niveles basales en normoxia de las proteínas bajo estudio. Las proteínas que se indican fueron detectadas por inmunoblot usando los anticuerpos específicos descritos en Materiales y Métodos.

Fig. 8. *Efecto de silibinin sobre la señalización de mTOR y la fosforilación de Akt en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata.* Las células PC-3 fueron cultivadas en hipoxia (1.5% de O<sub>2</sub>) durante 3 h en presencia de las concentraciones indicadas de silibinin (Sili). El carril 1 muestra los niveles basales en normoxia de las proteínas bajo estudio. Las proteínas que se indican fueron detectadas por inmunoblot usando los anticuerpos específicos descritos en Materiales y Métodos.

## Ejemplos

*Materiales y Métodos*

5 *Cultivos celulares y reactivos.* Células humanas de adenocarcinoma cervical (HeLa) y de carcinoma hepatocelular (Hep3B) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Barcelona, Spain) y cultivadas en DMEM o MEM (Sigma, St. Louis, MO), respectivamente. Las células CHO Ka13.5 deficientes en HIF-1 $\alpha$  se crecieron en una mezcla nutritiva Ham's F-12 (Invitrogen, Barcelona, Spain). Los medios de cultivo fueron suplementados con un 10% de FBS inactivado (Sigma) y penicilina (100 IU/ml)/estreptomicina (100  $\mu$ g/ml), y las células fueron crecidas a 37°C en un incubador humificado conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub>. Para la exposición a hipoxia las células fueron incubadas a 37°C en una cámara de hipoxia humificada (COY Labs., Grasslake, MI), insuflada con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>/95% N<sub>2</sub> (Air-Liquide, Madrid, Spain) y equipada con un regulador de O<sub>2</sub> para obtener la concentración deseada de O<sub>2</sub> (21-0.1%). Todos los tratamientos celulares se llevaron a cabo en un medio de crecimiento conteniendo 3% FBS y sin antibióticos. Silibinin, ciclohexamida, estaurosporina y Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) se compraron a Sigma. Dimetiloxalil glicina (DMOG) se compró en Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  fueron de BD Transduction Laboratories (BD Biosciences, Madrid, Spain). LY294002, rapamicina y los anticuerpos contra fosfo-Akt (Ser473), fosfo-mTOR (Ser2448), fosfo-p70S6 quinasa (Thr389), fosfo-proteína ribosomal S6 (Ser235/236) y fosfo-4E-BP1 (Ser65) fueron de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-actina se obtuvo de Sigma.

20 *Extractos celulares e inmunoblotting.* Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 60 mm y se las permitió adherirse por 24 horas. Inmediatamente después de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS frío y se recuperaron mediante raspado en 1-ml de PBS frío suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). Los pellets celulares fueron homogeneizados en 50  $\mu$ l de buffer de lisis compuesto por un reactivo de extracción de proteínas CytoBuster™ (Novagen) suplementado con cocteles de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasa (Sigma). Tras la incubación en hielo (15 min), los lisados fueron agitados y centrifugados (16,000 x g, 10 min, 4°C), y los sobrenadantes recolectados como extractos celulares totales. La concentración de proteínas se determinó por el ensayo de proteínas de BCA (Pierce). Los extractos celulares (40-80  $\mu$ g de proteínas) se separaron por SDS-PAGE y fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, y el inmunoblot se llevó a cabo como se ha descrito previamente. Cuando se requirió, la intensidad de las bandas fue cuantificada con el software Quantity One v4.6 (Bio-Rad, Hercules, CA).

35 *Construcción de los plásmidos.* El cDNA del HIF-1 $\alpha$  humano (GenBank accession U22431; SEQ ID NO: 1) fue obtenido del ATCC (pCEP4/HIF-1 $\alpha$ ). Subclonamos la región codificante completa de HIF-1 $\alpha$  dentro del vector de expresión pcDNA4/HisMax (Invitrogen) por PCR usando Pfu DNA polimerasa (Stratagene). Los primeros fueron diseñados para contener los sitios de restricción para *Bam*HI y *Not*I en las terminaciones 5' y 3', respectivamente. Se usaron los primers SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El producto de PCR amplificado fue purificado (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Valencia, CA), digerido con *Bam*HI y *Not*I, y ligado dentro de pcDNA4/HisMax previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción resultante, pcDNA4/HisMax-HIF-1 $\alpha$ , fue amplificada y purificada (Qiagen). El doble mutante HIF-1 $\alpha$  P402A/P564A fue generado por mutagénesis dirigida secuencial (QuickChange II, Stratagene) usando como patrón pcDNA4/HisMax-HIF-1 $\alpha$ . Los oligonucleótidos mutagénicos fueron, para la mutación P402A SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; para la mutación P564A, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7). Este mutante de HIF-1 $\alpha$  no es susceptible a la hidroxilación por las proli-4-hidroxilasas y a la subsiguiente degradación. La integridad de las construcciones fue confirmada por secuenciación del ADN. El plásmido reportero p9HIF1-Luc, conteniendo nueve copias en tándem del elemento de respuesta a hipoxia (HRE) del gen promotor humano VEGF fue donado por el Dr. Manuel O. Landázuri (Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain).

50 *Transfección transitoria y ensayo reportero de luciferasa dependiente de HRE.* La transfección transitoria de las células CHO Ka13.5 se llevó a cabo en placas de cultivo de 60 mm usando Lipofectamine2000 (Invitrogen) y 1  $\mu$ g del plásmido de DNA (HIF-1 $\alpha$  tipo silvestre, P402A/P564A-HIF-1 $\alpha$ , o el vector vacío). Para el ensayo reportero de luciferasa, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos y transfectadas con 0,3  $\mu$ g por pocillo del plásmido reportero p9HIF1-Luc usando el agente de transfección FuGENE 6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas, el medio fue reemplazado y las células fueron incubadas durante 6-8 horas con la droga y las concentraciones de O<sub>2</sub> indicadas. La eficiencia de transfección fue monitorizada por cotransfección con 0.1  $\mu$ g del plásmido control pRL-TK (Promega) portando el gen de *Renilla luciferasa*. Las actividades de firefly y *Renilla luciferasa* fueron ensayadas usando el Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega), y la actividad firefly luciferasa fue normalizada a la actividad de *Renilla luciferasa*.

60 *Cuantificación de VEGF.* La concentración de VEGF humano en el medio celular condicionado fue medida con un kit ELISA (Pierce). Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y cultivadas hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. El medio fue reemplazado y los cultivos fueron tratados como se indica. El VEGF secretado se cuantificó después de 12 h en el medio extracelular (50  $\mu$ l). Los resultados fueron normalizados respecto a la cantidad de proteína total por pocillo.

65 *RT-PCR.* El RNA total fue aislado de las células tumorales usando el RNeasy Mini kit (Qiagen) y 0.5  $\mu$ g fueron transcritos reversamente con 50 U SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen), usando un primer oligo-(dT) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El cDNA fue amplificado por PCR usando los siguientes sets de primers: para HIF-1  $\alpha$  humano: SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9 (GenBank NM\_001530); la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa



humana (GAPDH), SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 (GenBank NM\_002046). Las condiciones de PCR fueron establecidas en experimentos piloto para asegurar la linealidad de las tasas de reacción. La GAPDH fue usada como el estándar interno. Los productos de PCR fueron separados en geles de 1,5% de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Los geles fueron fotografiados usando un analizador de imagen Gel DOC 2000 (Bio-Rad).

5 *Proliferación celular y apoptosis.* La proliferación celular fue estudiada con el ensayo fluorimétrico Cell-Blue® Cell Viability Assay (Promega), que explota la habilidad del indicador resazurin para medir la capacidad metabólica, una indicación de la viabilidad celular. Para medir la apoptosis usamos el ensayo luminiscente Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega), que mide la actividad de caspasas-3 y -7. Ambos ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

10 *Análisis estadístico.* Donde se indica, los datos experimentales fueron analizados usando el software de Prism™ GraphPad (versión 4.0). Las diferencias significativas fueron determinadas por la prueba de t de Student (con dos colas) y los valores de P inferiores a 0.05 fueron considerados significativos.

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del uso combinado del silibinin y de inhibidores de la vía PI3K/Akt para el tratamiento del cáncer, en especial, aquellos tipos de cáncer en los que el silibinin activa indirectamente la vía PI3K/Akt.

20 Ejemplo 1

*Silibinin inhibe la acumulación de HIF-1 $\alpha$  inducida por hipoxia en células tumorales HeLa y Hep3B*

25 Para examinar el efecto del silibinin sobre la expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , primero se realizaron experimentos de inmunoblot en función del tiempo. La hipoxia indujo una acumulación de proteína HIF-1 $\alpha$  dependiente del tiempo en células tumorales HeLa y Hep3B que fue perceptible después de 1 h. Silibinin inhibió la acumulación de HIF-1 $\alpha$  (Fig. 1A), y esta inhibición fue completa dentro de la primera hora de tratamiento con silibinin en ambos tipos celulares, y persistió mientras la droga estuvo presente en el medio (por lo menos hasta 16 h, datos no mostrados). En cambio, el silibinin no alteró los niveles de proteína de HIF-1 $\beta$  (Fig. 1A).

30 Los experimentos dosis-respuesta mostraron que la disminución de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  producida por silibinin fue dosis-dependiente (Fig. 1B), demostrando una potencia comparable en las células HeLa y Hep3B (IC<sub>50</sub> ~150  $\mu$ mol/L). De manera semejante, el silibinin abrogó totalmente la acumulación de HIF-1 $\alpha$  inducida por el inhibidor DMOG (Fig. 1B), un agente hipóxico mimético bien caracterizado. Consistente con la inhibición de la acumulación de HIF-1 $\alpha$ , el silibinin también produjo la inhibición dosis-dependiente de la actividad transcripcional de HIF-1 en células expuestas a hipoxia ó tratadas con DMOG, según se determinó usando una construcción reportera de la respuesta a hipoxia (Fig. 1C).

40 Para investigar si el efecto inhibitorio del silibinin sobre la acumulación de HIF-1 $\alpha$  era dependiente de la severidad de la hipoxia celular, sometimos las células HeLa y Hep3B a hipoxia cada vez mayor en presencia o ausencia de silibinin. HIF-1 $\alpha$  comenzó a estabilizarse en concentraciones de O<sub>2</sub> del 6%, con la acumulación aumentando marcadamente conforme el O<sub>2</sub> disminuye hasta alcanzar una hipoxia severa (0.1% O<sub>2</sub>). Silibinin previno la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en todas las concentraciones O<sub>2</sub> probadas, demostrando su capacidad de inhibir HIF-1 $\alpha$  en cualquier grado de hipoxia celular (Fig. 1D).

45 Ejemplo 2

*Silibinin no afecta a la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  o a su degradación mediada por las proli-hidroxilasas*

50 HIF-1 $\alpha$  se degrada principalmente mediante el sistema ubiquitin/proteasoma tras la hidroxilación de las prolinas 402 y 564 por las proli-hidroxilasas específicas de HIF-1 $\alpha$ . Para testar la posibilidad de que silibinin inhiba la acumulación de HIF-1 $\alpha$  promoviendo su degradación y/o reduciendo la vida media de la proteína, se emplearon diversas estrategias experimentales. Primero se realizaron experimentos de reoxigenación. Las células fueron expuestas a hipoxia, y el silibinin o el vehículo fue agregados durante los últimos 15 minutos de incubación hipóxica. Al final de la incubación hipóxica (tiempo 0) las células fueron expuestas a normoxia, e incubadas por períodos crecientes hasta alcanzar los 30 min. Bajo estas condiciones, los niveles de HIF-1 $\alpha$  reflejarían principalmente la tasa de degradación de HIF-1 $\alpha$ . Aunque la acumulación de HIF-1 $\alpha$  fue levemente menor en células tratadas con silibinin, los índices de degradación de HIF-1 $\alpha$  en células no tratadas y tratadas fueron muy similares, con valores de vida media de la proteína de 13.5 $\pm$ 1.2 y 10.5 $\pm$ 1.0 min, respectivamente (Fig. 2A).

60 En una segunda aproximación experimental, se probó el efecto del silibinin sobre la estabilidad del doble mutante de prolina P402A/P564A de HIF-1 $\alpha$  (P402A/P564A-HIF-1 $\alpha$ ), que no puede ser hidroxilado por las proli-hidroxilasas y se acumula en las células de manera independiente del O<sub>2</sub>. Para evitar la interferencia del HIF-1 $\alpha$  endógeno, las construcciones P402A/P564A-HIF-1 $\alpha$  o HIF-1 $\alpha$  salvaje se expresaron en células deficientes en HIF-1 $\alpha$  CHO Ka13.5. Silibinin fue igualmente potente en la prevención de la acumulación del HIF-1 $\alpha$  salvaje y del mutante P402A/P564A-HIF-1 $\alpha$  (Fig. 2B), por lo tanto eliminando la posibilidad de que las proli-hidroxilasas de HIF-1 estén implicada en el efecto del silibinin. Resultados similares fueron obtenidos en las células HeLa. Juntos, estos resultados demuestran que el silibinin no afecta a la degradación de la proteína de HIF-1 $\alpha$ .

## Ejemplo 3

*Silibinin no afecta a la acumulación del mRNA de HIF-1 $\alpha$  pero disminuye la traducción de la proteína HIF-1 $\alpha$*

5 La carencia de efecto sobre la degradación de HIF-1 $\alpha$  indicó la posibilidad que el silibinin puede reducir la tasa de producción de HIF-1 $\alpha$ . El análisis por RT-PCR reveló que los niveles de mRNA de HIF-1 $\alpha$  seguían sin ser afectados por el tratamiento con el silibinin en normoxia e hipoxia (2 ó 4h) (Fig. 2C), indicando así que el silibinin no afecta a la acumulación del mRNA de HIF-1 $\alpha$ .

10 Para examinar si la inhibición de la acumulación de HIF-1 $\alpha$  mediada por silibinin fue debida a la reducción de la síntesis de la proteína HIF-1 $\alpha$ , se empleó el inhibidor del proteasoma MG132 para prevenir la degradación ubiquitin-dependiente de HIF-1 $\alpha$ . El tratamiento de células con MG132 dio lugar a una pronunciada acumulación de especies de proteínas de alto peso molecular de HIF-1 $\alpha$  - ubiquitinada, en normoxia y en hipoxia (el panel superior de la Fig. 2.a, carriles 2 y 6). Por el contrario, la inhibición de la síntesis de proteínas con ciclohexamida previno totalmente la acumulación de HIF-1 $\alpha$  ubiquitinada en presencia de MG132 (carriles 3 y 7). De manera similar, la adición de silibinin en presencia de MG132 dio lugar a una reducción substancial de HIF-1 $\alpha$ - ubiquitinada, en normoxia e hipoxia (carriles 4 y 8), sugiriendo interferencia con la maquinaria de síntesis de la proteína. Además, el silibinin mimetizó el efecto inhibitorio de la ciclohexamida sobre la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en las células que fueron incubadas con estas drogas bajo hipoxia por períodos crecientes (el panel inferior de la Fig. 2.a.). Estos resultados indican que el silibinin disminuye la traducción de HIF-1 $\alpha$ .

## Ejemplo 4

25 *La inhibición de la traducción de la proteína HIF-1 $\alpha$  por el silibinin implica la represión de mTOR y de sus efectores p70S6K, rpS6 y 4E-BP1*

30 La vía PI3K/Akt/mTOR se ha implicado en la regulación de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , predominantemente a nivel de su traducción. Por otra parte, evidencias recientes indican que la hipoxia causa la defosforilación y la represión de mTOR, dando como resultado una disminución de la tasa de síntesis de HIF-1 $\alpha$ . Para ver si el silibinin inhibe la síntesis de la proteína HIF-1 $\alpha$  en hipoxia a través de la regulación de la vía mTOR/p70S6K/4E-BP1, medimos el estado de fosforilación del mTOR y de sus efectores p70S6K, rpS6 y 4E-BP1, así como el de Akt. El tratamiento de las células HeLa y Hep3B con silibinin bajo condiciones hipóxicas produjo una defosforilación dosis-dependiente de mTOR en la Ser<sup>248</sup>, que se correlacionó con la inhibición de la fosforilación de p70S6K, de rpS6 y de 4E-BP1, y con la reducción de la acumulación de HIF-1 $\alpha$  en ambos tipos de líneas celulares tumorales (Fig. 3A).

40 También se encontró que de manera concomitante con la inhibición de la expresión de HIF-1 $\alpha$  y de la vía mTOR en células HeLa y Hep3B, el silibinin produjo la activación de Akt, como indica el incremento de la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> (Fig. 3A). Se observó que el inhibidor de mTOR rapamicina indujo un aumento pronunciado en p-Akt similar al observado con el silibinin, bajo condiciones normóxicas e hipóxicas (Fig. 3B). Notablemente, observamos una respuesta diferenciada entre las células HeLa y Hep3B con respecto al efecto del silibinin sobre Akt. Mientras en las células HeLa la fosforilación de Akt aumentó progresivamente con el aumento de la concentración del silibinin, en células Hep3B la inducción de Akt se invirtió a la dosis más alta (500  $\mu$ mol/L) y la fosforilación de Akt volvió a los niveles basales (Fig. 3A).

50 Esta diferencia a dosis elevadas de silibinin no tuvo ninguna implicación para la inhibición de HIF-1 $\alpha$ , que continuó siendo máxima en ambas variedades de células. La activación de p-Akt por el silibinin requirió la actividad de su regulador aguas arriba PI3K, puesto que el inhibidor LY294002 de PI3K bloqueó la fosforilación de Akt inducida por silibinin (Fig. 3B, el panel derecho, y Fig. 3C). Por otra parte, se encontró que LY294002 acentuó la inhibición de la expresión de HIF-1 $\alpha$  mediada por silibinin, así como la represión de la vía mTOR (reflejado por la pérdida de p-p70S6K) (Fig. 3C). Para investigar mejor el efecto del silibinin sobre mTOR y la señalización de Akt en lo referente a la inhibición de la expresión de HIF-1 $\alpha$ , se expusieron las células HeLa y Hep3B a hipoxia y posteriormente fueron tratadas con silibinin durante los últimos 10 a 60 minutos de incubación hipóxica. El silibinin indujo una inhibición rápida y potente de la acumulación de HIF-1 $\alpha$  que alcanzó el 70-80% en células Hep3B a los 10 min tras el tratamiento y fue completa tras 60 min (Fig. 4). En células HeLa, la inhibición del 70-80% se alcanzó a los 20 minutos de tratamiento y fue también completa hacia el minuto 60. En ambos tipos de células, la defosforilación de mTOR inducida por silibinin y sus efectores se detectaron en el plazo de 10-20 minutos del tratamiento bajo condiciones hipóxicas, y dio lugar a la pérdida total de p-p70S6K después de 20-30 minutos (Fig. 4). De manera similar, hubo una reducción paralela de p-rpS6 que fue casi completa después de 1 h de tratamiento. Es significativo que la disminución en p-4E-BP1 fue más rápida y más pronunciada en células Hep3B que en HeLa, probablemente debido a la presencia de niveles basales más elevados de p-4E-BP1 en células HeLa.

65 Consistente con los experimentos dosis-respuesta, el nivel de p-Akt en células HeLa se incrementó tras la exposición durante 20 minutos al silibinin (500  $\mu$ mol/L), mientras que disminuyó por debajo de niveles basales en células Hep3B. Notablemente, la inhibición de la acumulación de HIF-1 $\alpha$  fue revertida rápidamente después de dos cambios del medio para eliminar el silibinin de las células. Esta reversión fue evidente después de 30 minutos y fue completa después de 60 minutos bajo la misma atmósfera hipóxica (Fig. 4, carriles 7 y 8). Asimismo, tras la eliminación del si-

libinin, todas las fosfo-proteínas analizadas volvieron a sus niveles basales de fosforilación. Estos resultados sugieren que la reducción de la vía mTOR/p70S6K/4E-BP1 está implicada en la inhibición de la traducción de la proteína de HIF-1 $\alpha$  por el silibinin.

#### 5 Ejemplo 5

##### *Silibinin inhibe la secreción de VEGF inducida por hipoxia en células tumorales*

10 Silibinin ha demostrado características anti-angiogénicas en varios modelos experimentales. Puesto que HIF-1 es el regulador principal de VEGF en hipoxia, se analizó el efecto del silibinin sobre la producción de VEGF *in vitro*. Comparado con normoxia, la exposición de las células HeLa o Hep3B a hipoxia durante 12 h produjo un aumento de 2-3 veces de la secreción de VEGF al medio extracelular. Silibinin inhibió de manera dosis-dependiente la liberación de VEGF inducida por hipoxia en ambas líneas celulares: 250  $\mu\text{mol/L}$  de silibinin produjo una inhibición del ~25% en células HeLa y una inhibición del ~40% en células Hep3B, mientras que con 500  $\mu\text{mol/L}$  la inhibición alcanzó más del 90% en ambos tipos celulares (Fig. 5A). No se observaron efectos significativos a concentraciones más bajas (50 y 100  $\mu\text{mol/L}$ ).

También se examinó el efecto del silibinin en la liberación de VEGF inducida por hipoxia en comparación y en combinación con inhibidores de PI3K/Akt o de mTOR. El inhibidor de PI3K/Akt LY294002 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) produjo una inhibición de la liberación de VEGF (el ~30%) similar a la inducida por una dosis submáxima de silibinin (250  $\mu\text{mol/L}$ ), mientras que el inhibidor de mTOR rapamicina (20 nmol/L) produjo una inhibición débil del ~15% (Fig. 5B). Interesantemente, *el tratamiento combinado con estas dosis de silibinin y LY294002 dio lugar a un efecto sinérgico*, reduciendo la liberación de VEGF cerca de los niveles control en normoxia. En cambio, el tratamiento combinado del silibinin y la rapamicina no produjeron ningún efecto aditivo. A la dosis máxima de silibinin (500  $\mu\text{mol/L}$ ), la inhibición de la liberación de VEGF inducida por hipoxia fue superior al 90% con independencia de la presencia de inhibidores adicionales.

#### Ejemplo 6

##### *Silibinin inhibe la proliferación de las células HeLa y Hep3B*

El examen del efecto del silibinin sobre la proliferación de las células tumorales HeLa y Hep3B reveló una inhibición dosis-dependiente en ambas líneas celulares que fue evidente después del tratamiento durante 2 h y aumentó con el tiempo de incubación (Fig. 6A). Comparado con los controles, el tratamiento de células HeLa con silibinin durante 2 a 8 h bajo condiciones hipóxicas dio lugar a reducciones en el número total de células que fue desde el 35% (2 h) hasta el 45% (8 h) con 250  $\mu\text{mol/L}$ , y de un 60-75% durante el mismo período con 500  $\mu\text{mol/L}$ . No hubo diferencias significativas con 50  $\mu\text{mol/L}$ , y solamente una inhibición débil del ~10% con 100  $\mu\text{mol/L}$  tras 8 h. Tras un tratamiento similar de las células Hep3B se inhibió el crecimiento en un 5-15% con 50  $\mu\text{mol/L}$ , 15-25% con 100  $\mu\text{mol/L}$ , 20-45% con 250  $\mu\text{mol/L}$ , y 40-72% con 500  $\mu\text{mol/L}$ . En normoxia, silibinin produjo un efecto inhibitorio idéntico sobre el crecimiento celular (datos no mostrados).

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt.

5

2. Composición según la reivindicación anterior para su uso como medicamento.

10

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el inhibidor de la vía PI3K/Akt se selecciona de la lista que comprende: LY294002, Wortmannin, Triciribine (API-2, NSC-154020, TCN, Akt inhibitor V), A-443654, KP372-1, Akt Inhibitor II (SH-5), Akt Inhibitor III (SH-6), Akt Inhibitor IV, Akt Inhibitor VIII (Isozyme-Selective, Akti-1/2), Akt Inhibitor X.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el inhibidor de la vía PI3K/Akt es LY294002.

15

5. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

6. Uso de la composición según la reivindicación anterior donde el cáncer se selecciona de la lista que comprende: cáncer cervical, cáncer gastrointestinal o cáncer hepático.

20

7. Uso de la composición según la reivindicación 5 donde el cáncer es cáncer cervical.

8. Preparación combinada de, al menos, silibinin y un inhibidor de la ruta PI3K/Akt para su uso por separado, simultáneo ó secuencial en el tratamiento del cáncer.

25

9. Uso de una preparación combinada de al menos, silibinin y un inhibidor de la ruta PI3K/Akt por separado, de manera simultánea o secuencial en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

30

10. Uso de una preparación según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, donde el cáncer se selecciona de la lista que comprende: cáncer cervical, cáncer gastrointestinal o cáncer hepático.

11. Uso de una preparación según la reivindicación 10, donde el cáncer es cáncer cervical.

35

40

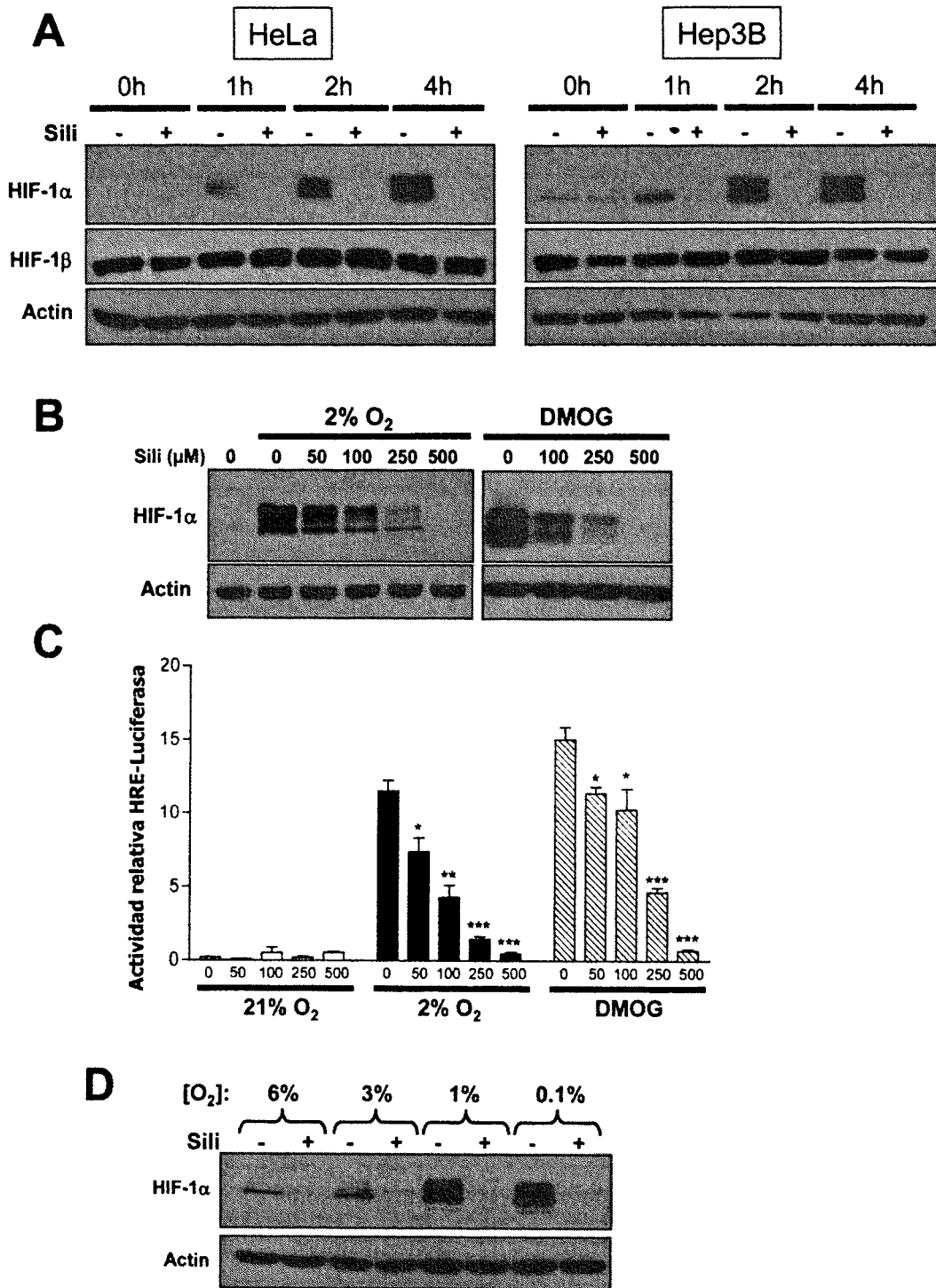
45

50

55

60

65



**FIG. 1**

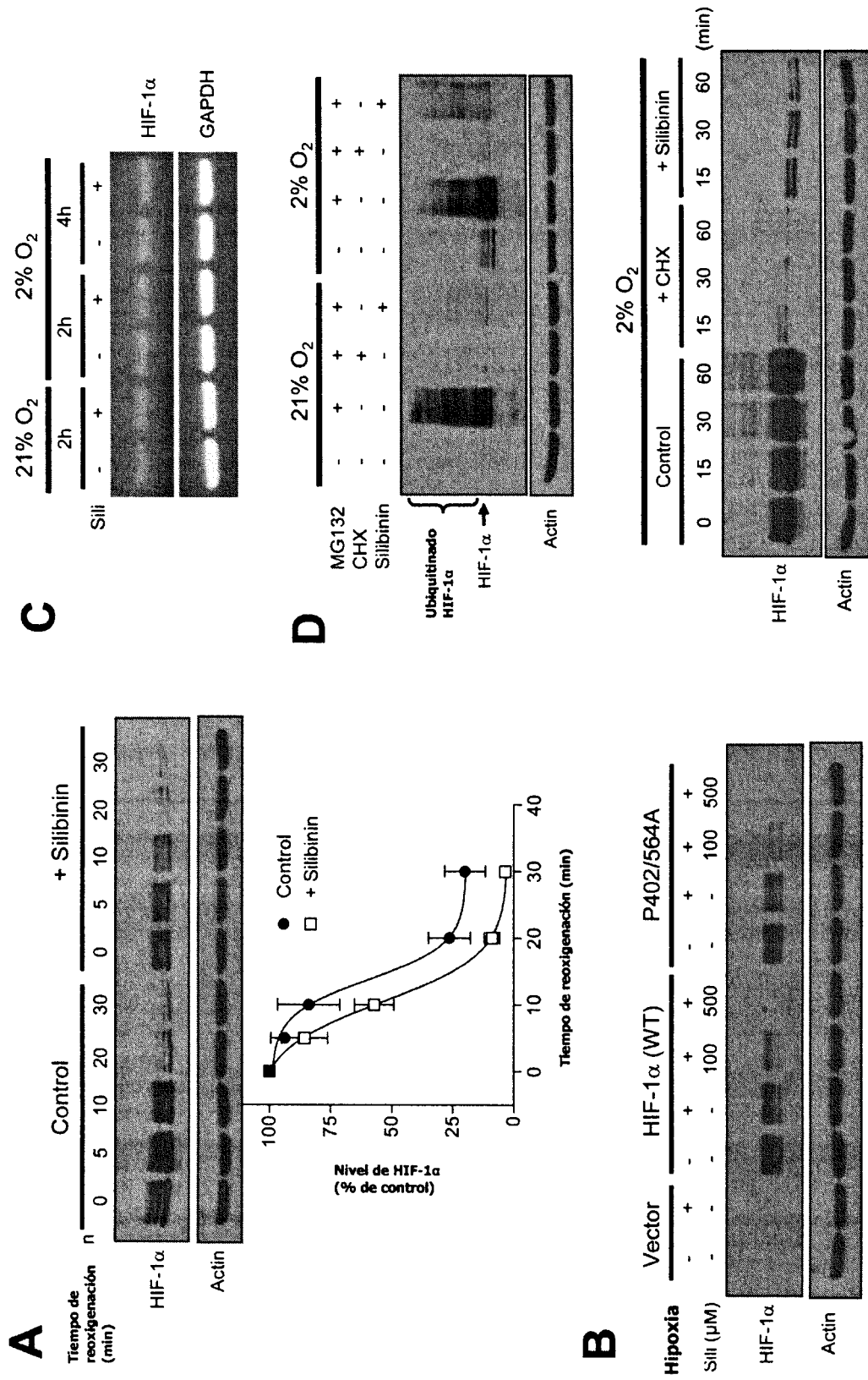


FIG. 2

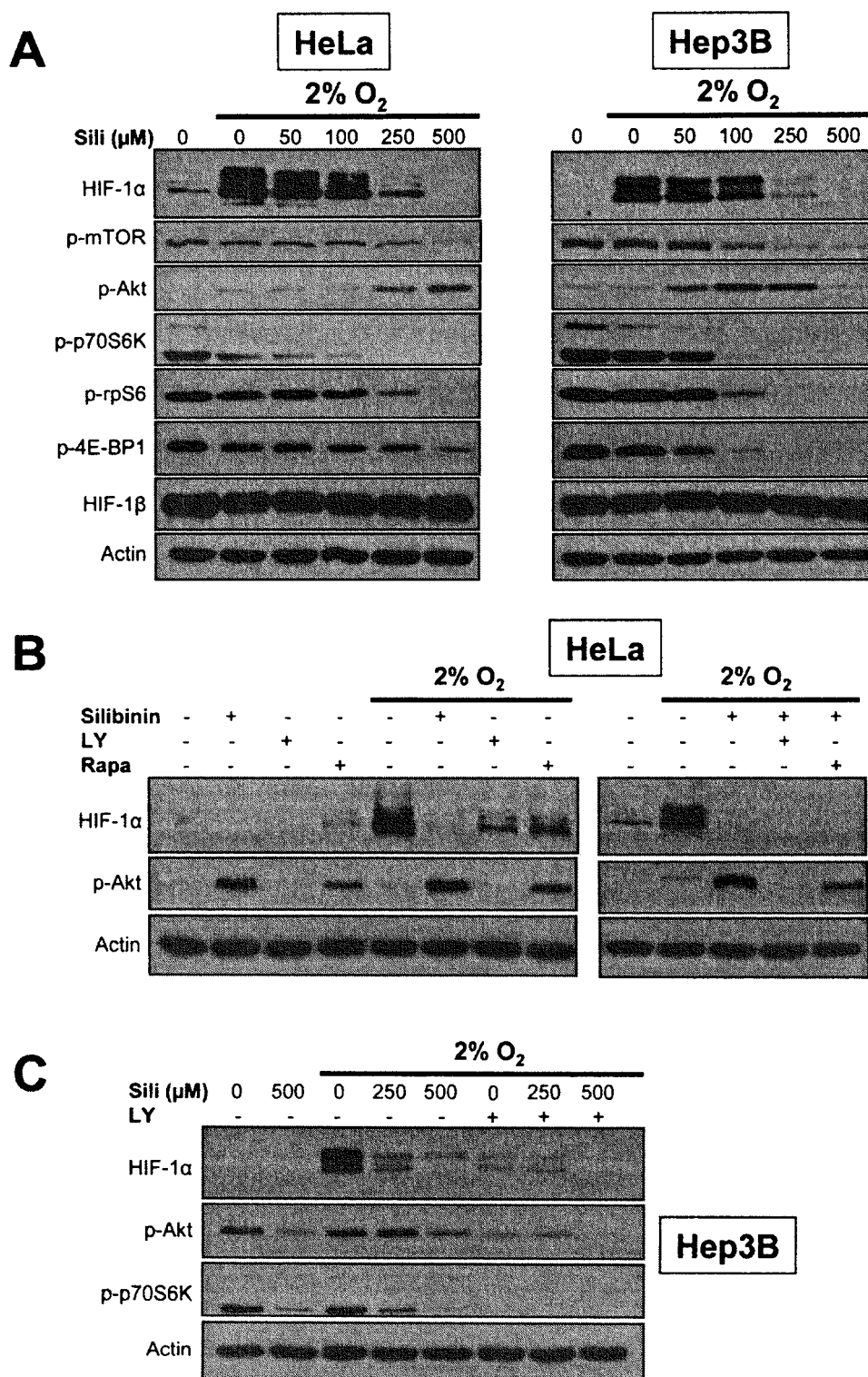


FIG. 3

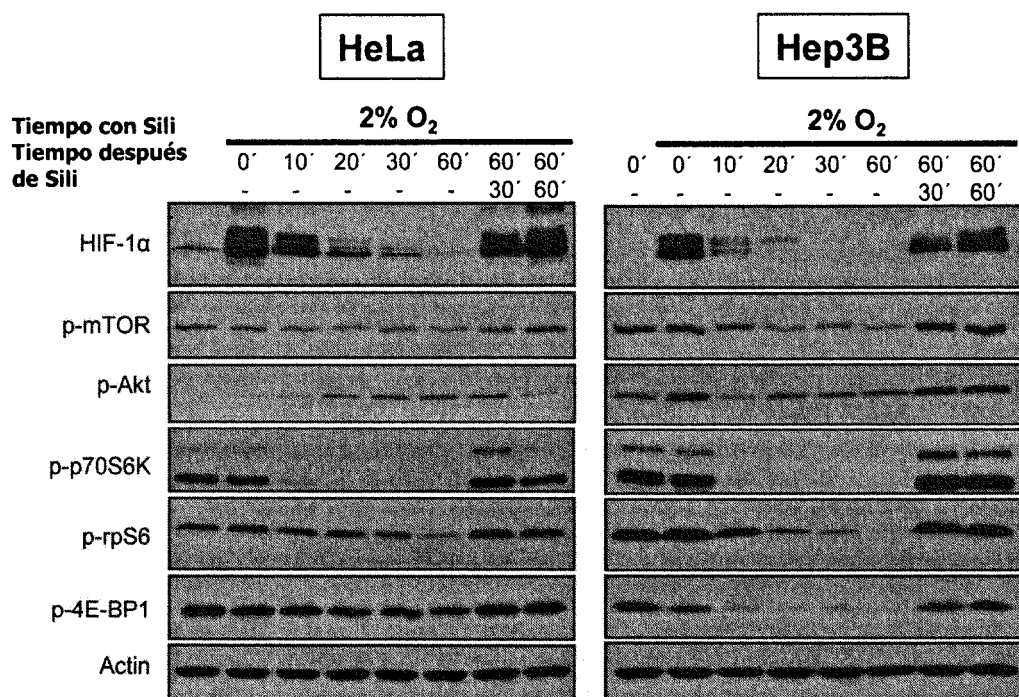
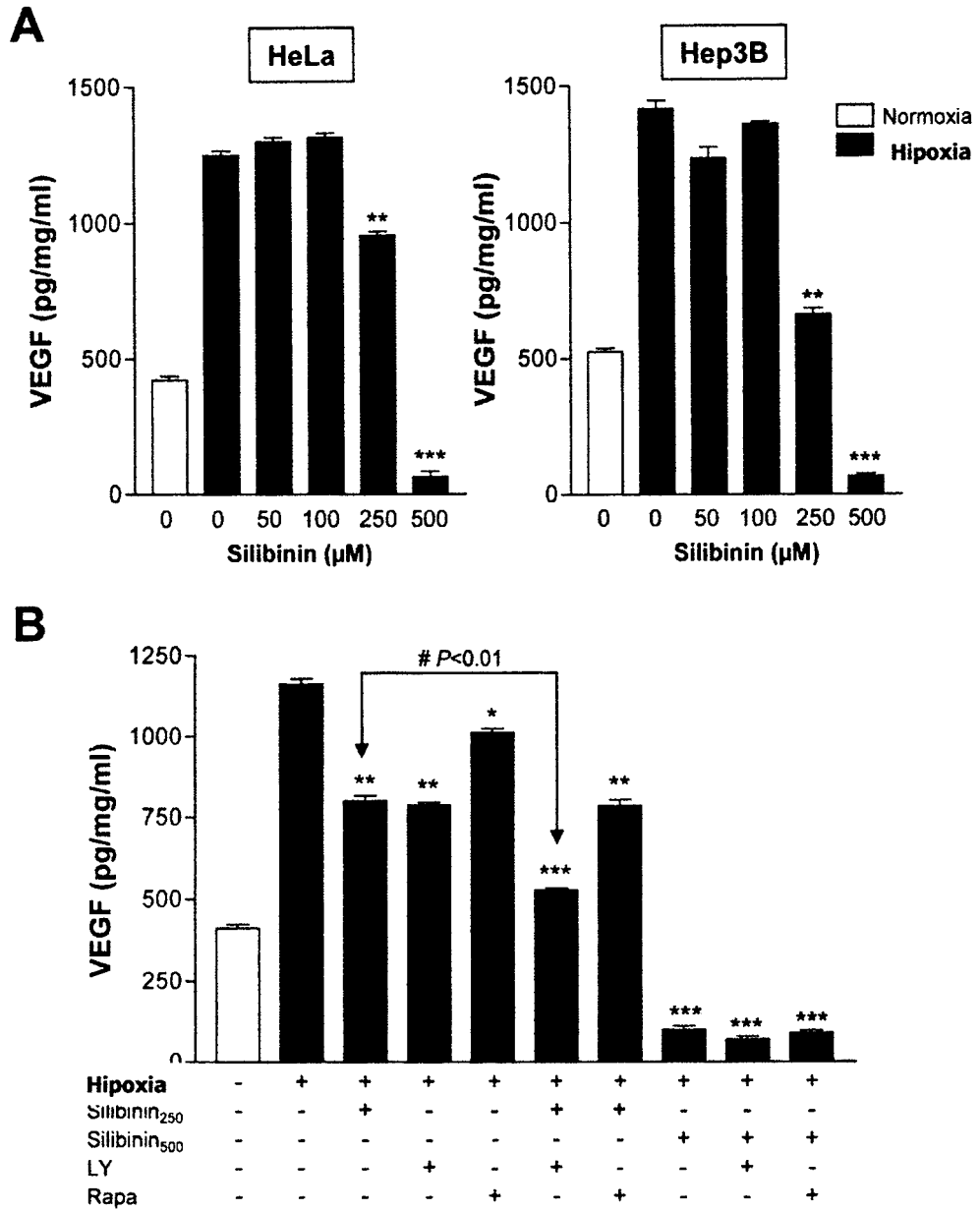
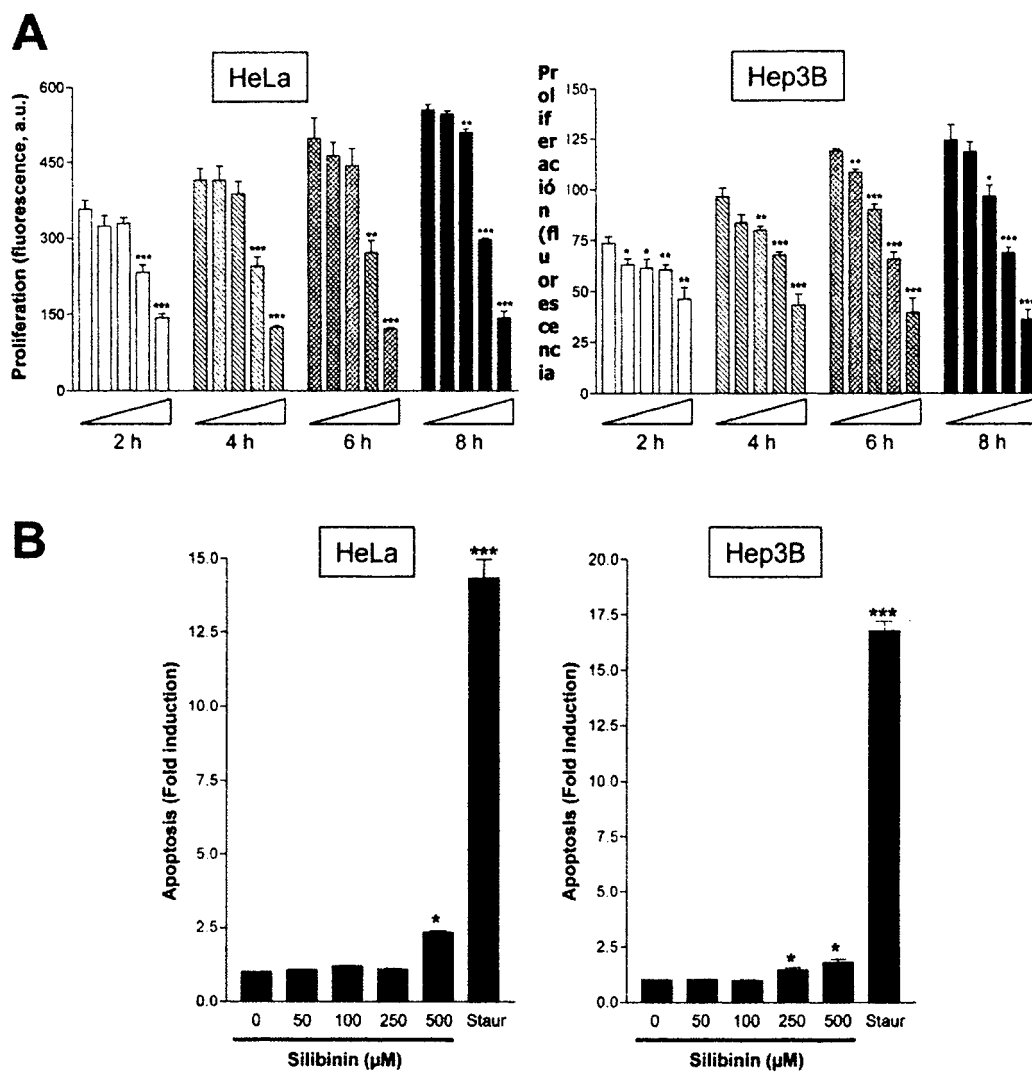


FIG. 4



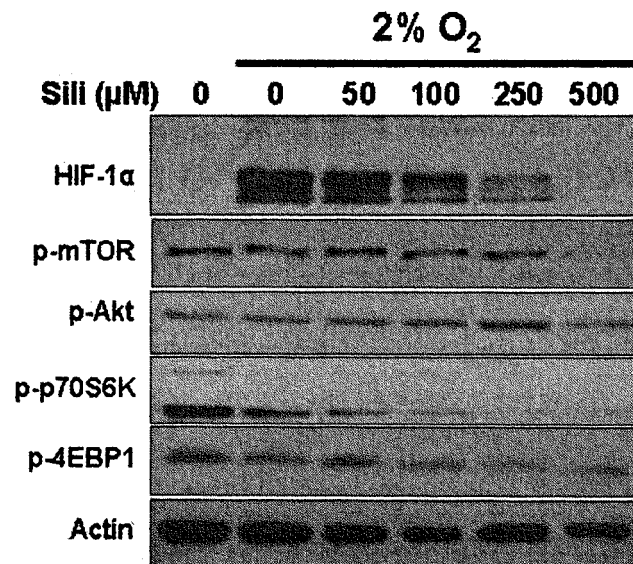


**FIG. 5**



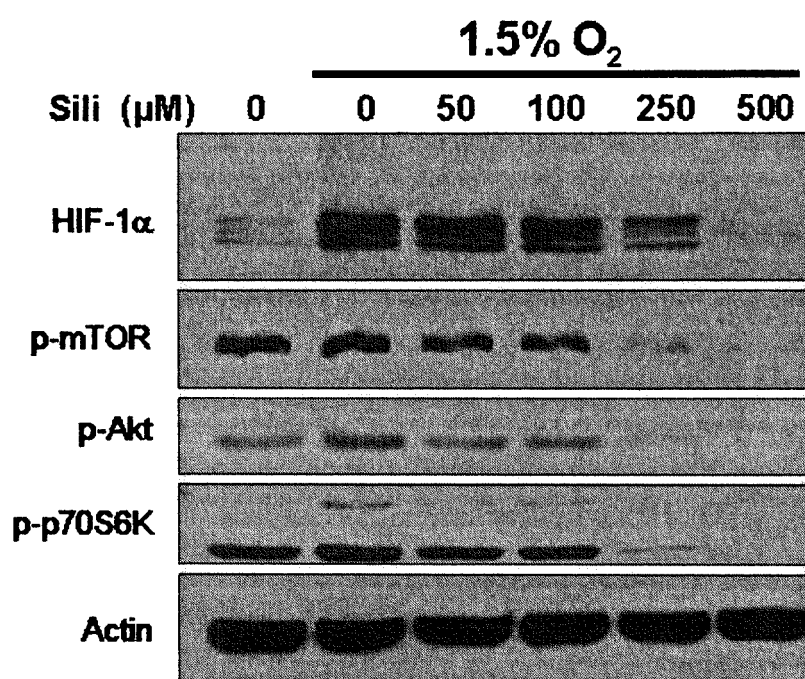
**FIG. 6**

## Células de cáncer gastrointestinal (AGS)



**FIG. 7**

## Células de cáncer de próstata



**FIG. 8**

# ES 2 345 587 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC)

5 <120> Composición que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3 $\kappa$ /Akt para el tratamiento del cáncer

<130> ES1997.2

10 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 3678

<212> DNA

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

gtgaagacat cgcggggacc gattcaccat ggagggcgcc ggcggcgcgga acgacaagaa  
60

25 aaagataagt tctgaacgtc gaaaagaaaa gtctcgagat gcagccagat ctcggcgaag  
120

30 taaagaatct gaagtttttt atgagcttgc tcatcagttg ccacttccac ataatgtgag  
180

ttcgcattctt gataaggcct ctgtgatgag gcttaccatc agctatttgc gtgtgaggaa  
240

35 acttctggat gctggtgatt tggatattga agatgacatg aaagcacaga tgaattgctt  
300

ttatttgaaa gccttggatg gttttgttat gtttctcaca gatgatggtg acatgattta  
360

40 catttctgat aatgtgaaca aatacatggg attaactcag tttgaactaa ctggacacag  
420

tgtgtttgat tttactcatc catgtgacca tgaggaaatg agagaaatgc ttacacacag  
480

45 aaatggcctt gtgaaaaagg gtaaagaaca aaacacacag cgaagctttt ttctcagaat  
540

50 gaagtgtacc ctaactagcc gaggaagaac tatgaacata aagtctgcaa catggaaggt  
600

attgcactgc acaggccaca ttcacgtata tgataccaac agtaaccaac ctcagtgtgg  
660

55 gtataagaaa ccacctatga cctgcttggt gctgatttgt gaaccattc ctcacctatc  
720

aaatattgaa attcctttag atagcaagac tttctcagt cgacacagcc tggatatgaa  
780

60 attttcttat tgtgatgaaa gaattaccga attgatggga tatgagccag aagaactttt  
840

aggccgctca atttatgaat attatcatgc tttggactct gatcatctga ccaaaactca  
900

65 tcatgatatg tttactaaag gacaagtcac cacaggacag tacaggatgc ttgccaaaag

# ES 2 345 587 A1

960

5 aggtggatat gtctggggtg aaactcaagc aactgtcata tataacacca agaattctca  
1020

10 accacagtgc attgtatgtg tgaattacgt tgtgagtggg attattcagc acgacttgat  
1080

15 tttctccctt caacaaacag aatgtgtcct taaaccgggt gaatcttcag atatgaaaat  
1140

20 gactcagcta ttcaccaaag ttgaatcaga agatacaagt agcctctttg acaaacttaa  
1200

25 gaaggaacct gatgctttta ctttgctggc cccagccgct ggagacacaa tcatatcttt  
1260

30 agatthttggc agcaacgaca cagaaactga tgaccagcaa cttgaggaag taccattata  
1320

35 taatgatgta atgctcccct cacccaacga aaaattacag aatataaatt tggcaatgtc  
1380

40 tccattaccc accgctgaaa cgccaaagcc acttcgaagt agtgctgacc ctgcaactca  
1440

45 tcaagaagtt gcattaaaat tagaaccaaa tccagagtca ctggaacttt cttttacat  
1500

50 gccccagatt caggatcaga cacctagtcc ttccgatgga agcactagac aaagttcacc  
1560

55 tgagccta atgtcccagt aatattgttt ttatgtggat agtgatatgg tcaatgaatt  
1620

60 caagttggaa ttggtagaaa aactthttg c tgaagacaca gaagcaaaga acccattttc  
1680

65 tactcaggac acagatttag acttgagat gttagctccc tatatcccaa tggatgatga  
1740

70 cttccagtta cgttccttcg atcagttgtc accattagaa agcagttccg caagccctga  
1800

75 aagcgcagat cctcaaagca cagttacagt attccagcag actcaaatac aagaacctac  
1860

80 tgcta atgccc accactacca ctgccaccac tgatgaatta aaaacagtga caaaagaccg  
1920

85 tatggaagac attaaaatat tgattgcatc tccatctcct acccacatac ataaagaaac  
1980

90 tactagtgcc acatcatcac catatagaga tactcaaagt cggacagcct caccaaacag  
2040

95 agcaggaaaa ggagtcatag aacagacaga aaaatctcat ccaagaagcc ctaacgtggt  
2100

100 atctgtcgct ttgagtcaaa gaactacagt tcttgaggaa gaactaaatc caaagatact  
2160

105 agctthtgag aatgctcaga gaaagcga aaatggaacat gatggttcac tthttcaagc  
2220

110 agtaggaatt ggaacattat tacagcagcc agacgatcat gcagctacta catcactttc  
65

ES 2 345 587 A1

2280

ttggaaacgt gtaaaaggat gcaaacttag tgaacagaat ggaatggagc aaaagacaat  
2340

5

tattttaata ccctctgatt tagcatgtag actgctgggg caatcaatgg atgaaagtgg  
2400

10

attaccacag ctgaccagtt atgattgtga agttaatgct cctatacaag gcagcagaaa  
2460

cctactgcag ggtgaagaat tactcagagc tttggatcaa gttaactgag ctttttctta  
2520

15

atctattcc tttttttgga cactgggtggc tcactaccta aagcagtcta tttatatttt  
2580

ctacatctaa ttttagaagc ctggctacaa tactgcacaa acttgggttag ttcaattttt  
2640

20

gatccccctt ctacttaatt tacattaatg ctctttttta gtatgttctt taatgctgga  
2700

tcacagacag ctcaatttct cagttttttg gtatttaaac cattgcattg cagtagcatc  
2760

25

attttaaaaa atgcaccttt ttattttattt atttttggct agggagttaa tccctttttc  
2820

gaattatttt taagaagatg ccaatataat ttttgaaga aggcagtaac ctttcatcat  
2880

30

gatcataggc agttgaaaaa tttttacacc ttttttttca cattttacat aaataataat  
2940

gctttgcccag cagtacgtgg tagccacaat tgcacaatat attttcttaa aaaataccag  
3000

35

cagttactca tggaatatat tctgcgttta taaaactagt ttttaagaag aaattttttt  
3060

40

tggcctatga aattgttaaa cctggaacat gacattgtta atcatataat aatgattcct  
3120

aatgctgta tggtttatta tttaaattggg taaagccatt tacataatat agaaagatat  
3180

45

gcatatatct agaaggtagt tggcatttat ttggataaaa ttctcaattc agagaaatca  
3240

tctgatgttt ctatagtcac tttgccagct caaaagaaaa caatacccta tgtagtgtg  
3300

50

gaagtttatg ctaatattgt gtaactgata ttaaaccctaa atgttctgcc taccctgttg  
3360

gtataaagat attttgagca gactgtaaac aagaaaaaaaa aatcatgca ttcttagcaa  
3420

55

aattgcctag tatgttaatt tgctcaaaat acaatgtttg attttatgca ctttgtcgct  
3480

60

attaacatcc tttttttcat gtagatttca ataattgagt aatttttagaa gcattatttt  
3540

aggaatatat agttgtcaca gtaaatatct tgttttttct atgtacattg tacaattttt

65

ES 2 345 587 A1

3600

tcatttccttt tgctctttgt ggttggatct aacactaact gtattgtttt gttacatcaa  
3660

5

ataaacatct tctgtgga  
3678

<210> 2

10 <211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 2

20

gagaggatcc agatggaggg cgccggcggc g  
31

<210> 3

25 <211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 3

35

gagagcggcc gctcagttaa cttgatccaa agctctgagt a  
41

<210> 4

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

45 <220>

<223> cebador (oligonucleótido mutagénico)

<400> 4

50

actttgctgg ccgcagccgc tggag  
25

<210> 5

55 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

60 <220>

<223> cebador (oligonucleótido mutagénico)

<400> 5

65

ctccagcggc tgcggccagc aaagt  
25



## ES 2 345 587 A1

<210> 6  
<211> 35  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador (oligonucleótido mutagénico)  
10

<400> 6  
    **cttggagatg ttagctgcct atatcccaat ggatg**  
        35

15 <210> 7  
<211> 35  
<212> DNA  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador (oligonucleótido mutagénico)  
25

<400> 7  
    **catccattgg gatataggca gctaacatct ccaag**  
        35

30 <210> 8  
<211> 24  
<212> DNA  
35 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador  
40

<400> 8  
    **cgttgtgagt ggtattattc agca**  
        24

45 <210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
50 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador  
55

<400> 9  
    **cagtttctgt gtcgttgctg cc**  
        22

60 <210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
65 <213> Artificial

# ES 2 345 587 A1

<220>

<223> cebador

5 <400> 10

**agtggggtga tgctggtgct g**  
**21**

<210> 11

10 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

15

<220>

<223> cebador

20 <400> 11

**cgctgcttc accaccttct t**  
**21**

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 587

② N° de solicitud: 200802800

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.10.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/357** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CHEN et al. "Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways". CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS. 20.10.2005. Vol. 156, N° 2-3, páginas 141-150. ISSN 0009-2797.	1-11

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.09.2010

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.09.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-11	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-11	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Chen et al. "Silibinin inhibits cell invasion through inactivation of both PI3K-Akt and MAPK signaling pathways". CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS. 20.10.2005. Vol. 156, N° 2-3, páginas 141 - 150. ISSN 0009-2797	20-10-2005

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

La presente solicitud divulga el uso de una composición que comprende silibinin, en distintas cantidades, para ser usada para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Adicionalmente divulga una composición formada por silibinin y un inhibidor de Akt y su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

La reivindicación 1 se refiere a una composición que comprende silibinin y un inhibidor de la vía PI3K/Akt, y la reivindicación 2 selecciona un grupo de 10 inhibidores. Sin embargo, la solicitud no aporta datos que relacionen tales composiciones con algunas propiedades o actividades que las configuren como elementos válidamente reivindicados por suponer una contribución al estado de la técnica, de manera similar a como aparecen en el caso de la reivindicación 4, donde se divulga, con claridad, el efecto sinérgico de la composición silibinin + LY294002. Por tanto, la solicitud tal y como se presenta no es clara y concisa, dado que las reivindicaciones no están enteramente basadas en la descripción.

D01 (página 146) divulga diferentes composiciones, entre ellas LY294002 + silibinin, utilizados en ensayos de inhibición de crecimiento celular, con células A549, resultando en una inhibición de la capacidad de secreción de MMP-2 de hasta un 64,4%. Por tanto, las reivindicaciones 1-4, 8, 9, en la medida que contienen ese compuesto, no serían nuevas, según se menciona en el art. 6 de la LP.

Dado que este documento también divulga que la acción de la silibinin se realiza a través de la inhibición de la vía Akt, y que esto lleva a una reducción de la capacidad de invasión de células cancerígenas, el uso de la composición Y294002 + silibinin para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer es algo que se deriva de manera obvia del estado de la técnica. Por tanto, las reivindicaciones 6, 7, 11 no tendrían actividad inventiva, según se menciona en el art.8 de la LP.

Igualmente, las reivindicaciones 1-11 en la medida que su contenido exceda el alcance de lo divulgado en la descripción, carecerían de actividad inventiva, puesto que no todas las posibles soluciones comprendidas en las mismas supondrían una contribución sobre el estado de la técnica. Así pues, no cumplirían lo mencionado en el art. 8 de la LP