



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 624**

51 Int. Cl.:
A61K 31/36 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08016665 .5**
96 Fecha de presentación : **15.10.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **2018858**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2009**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas usando compuestos de arsénico.**

30 Prioridad: **15.10.1997 US 62375 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2011

73 Titular/es: **POLARX BIOPHARMACEUTICALS, Inc.**
48th Floor, 787 Seventh Avenue
New York, New York 10019, US

72 Inventor/es: **Ellison, Ralph M. y**
Mermelstein, Fred H.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 358 624 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas primarias y metastásicas usando compuestos de arsénico.

1. CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón. En la práctica del tratamiento de cáncer, se usan composiciones que contienen trióxido de arsénico para detener e invertir el crecimiento neoplásico.

10 Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevos métodos quimioterápicos, nuevos usos de trióxido de arsénico para tratar un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, de pulmón, ovárico, de vejiga, renal, de próstata y de pulmón.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 En 1997 más de un millón de personas desarrollarán algún tipo de cáncer en los Estados Unidos. Aproximadamente 500.000 se curarán o estarán en un estado de remisión. Estas cifras representan una mejora de la tasa de curación que se observa a lo largo de la última década, que se debe en gran parte a la detección temprana, al mejor tratamiento y a los avances en quimioterapia. En particular, los avances en quimioterapia incluyen la terapia con fármacos dirigida o específica, en la que se desarrolla un fármaco específicamente para el tratamiento de cierto tipo de cáncer. Este enfoque "orientado a la enfermedad" se diseña para identificar compuestos que ejercen efectos selectivos *in vitro* sobre tipos particulares de tumores y para hacer un seguimiento de estas 20 pistas *in vivo* utilizando líneas celulares, (Fiebig y col., *Cancer Treatment Reviews* 17: 109-117 (1990)). Sin embargo, la incidencia de cáncer continúa subiendo a medida que envejece la población y a medida que se desarrollan o se presentan nuevos cánceres con más frecuencia, tal como en los pacientes infectados con el virus del SIDA. De este modo, está claro que existe una enorme demanda de regímenes adicionales para tratar a los pacientes con cáncer.

25 2.1. Patobiología del cáncer

El cáncer se caracteriza principalmente por un aumento en el número de células anormales derivadas de un tejido normal dado, una invasión de tejidos adyacentes por estas células anormales, y una diseminación linfática o transmitida por sangre de células malignas hacia los nódulos linfáticos regionales y hacia sitios distantes (metástasis). Los datos clínicos y estudios biológicos moleculares indican que el cáncer es un proceso de múltiples 30 etapas que comienza con cambios preneoplásicos pequeños, que pueden evolucionar en determinadas condiciones hasta la neoplasia.

El crecimiento preneoplásico de las células anormales está ejemplificado por la hiperplasia, la metaplasia, o, más particularmente, la displasia (para un repaso de tales condiciones anormales, véase Robbins y Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, pág. 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada que implica un aumento del número de células en un tejido u órgano, sin alteración significativa en la estructura o función. Sólo como ejemplo, la hiperplasia endometrial frecuentemente precede al cáncer endometrial. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en el que un tipo de célula adulta 35 sustituye a otro tipo de célula adulta o totalmente diferenciada. La metaplasia puede presentarse en células epiteliales o del tejido conjuntivo. La metaplasia atípica implica un epitelio metaplásico en cierto modo desordenado. La displasia es frecuentemente un predecesor del cáncer, y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación de la arquitectura de las células. Las células displásicas con frecuencia tienen núcleos anormalmente grandes, profundamente teñidos, y exhiben pleomorfismo. La displasia se presenta de forma característica donde existe irritación o inflamación crónica, y se encuentra frecuentemente en el cuello uterino, los 40 conductos respiratorios, la cavidad oral y la vesícula biliar.

La lesión neoplásica puede evolucionar de manera clonal y desarrollar un aumento de la capacidad de invasión, crecimiento, metástasis y heterogeneidad, especialmente en condiciones en las que las células neoplásicas escapan de la vigilancia inmunitaria del hospedante (Roitt, I., Brostoff, J y Kale, D., 1993, *Immunology*, 3ª ed., Mosby, St. Louis, pág. 17.1-17.12).

50 2.4. Cánceres de mama, pulmón, vejiga y próstata

Se sabe que el cáncer de mama aparece en aproximadamente una de cada 8-9 mujeres en los Estados Unidos de América. El tratamiento para el cáncer de mama prematuro es la cirugía, con o sin terapia de radiación, o cirugía, con o sin terapia de radiación, más quimioterapia y/o terapia hormonal. A pesar de los mejores esfuerzos de los médicos, todavía hay más de 80.000 muertes cada año debido al cáncer de mama, y la incidencia todavía sigue 55 creciendo. La quimioterapia actual para pacientes con cáncer de mama primario o metastásico incluye el tratamiento con ciclofosfamida, metotrexato, doxorubicina, 5-fluorouracilo, cisplatino, vinblastina, taxol, taxotere, mitomicina C, y

ocasionalmente otros agentes. Desafortunadamente, incluso con estos agentes, casi todas las mujeres que desarrollan cáncer de mama metastásico sucumben a su enfermedad. Un lugar particular en el que el cáncer de mama metastásico se metastatiza es el sistema nervioso central. Cuando se produce la metástasis del sistema nervioso central, el tratamiento habitual es la cirugía (para una metástasis solitaria) o radiación, o cirugía más terapia de radiación. Actualmente no hay ninguna quimioterapia que sea de ayuda en esta situación.

En cáncer de pulmón es responsable de más de 150.000 muertes cada año en los Estados Unidos de América. La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón presentan un tumor que ya se ha metastatizado a una variedad de órganos, incluyendo el pulmón, hígado, cápsulas suprarrenales y otros órganos. El tratamiento actual para el cáncer de pulmón metastásico todavía no está estandarizado (Ihde, Daniel C., "Chemotherapy of Lung Cancer", *The New England Journal of Medicine* 327:1434-1441, emisión de 12 de noviembre de 1992). Sin embargo, los regímenes de quimioterapia que se utilizan incluyen tratamiento con cisplatino más etopósido, combinaciones de ciclofosfamida más doxorubicina más cisplatino, y agentes individuales solos o en combinación, incluyendo ifosfamida, tenipósido, vindesina, carboplatino, vincristina, taxol, mostaza de nitrógeno, metotrexato, hexametilmelamina y otros. A pesar de estos regímenes quimioterapéuticos, el paciente medio con cáncer de pulmón metastásico todavía sólo sobrevive 7-12 meses. Otro lugar problemático particular para las metástasis de cáncer de pulmón es el sistema nervioso central. El tratamiento para las metástasis en el sistema nervioso central incluye cirugía (para eliminar la lesión solitaria), terapia de radiación, o una combinación de ambas. Desafortunadamente, no hay ninguna quimioterapia estándar que sea de ayuda en esta situación.

Cada año, aproximadamente 11.000 pacientes mueren de cáncer de vejiga en los Estados Unidos de América. Aunque en la evaluación la enfermedad está habitualmente localizada, la mayoría de los pacientes desarrollan una enfermedad metastásica distante. Los avances más recientes han estado en el área de la quimioterapia para pacientes con tal enfermedad metastásica. Un régimen eficaz se denomina el régimen MVAC. Consiste en el tratamiento con metotrexato más vinblastina más adriamicina (doxorubicina) más cisplatino. Aunque la tasa de respuesta es elevada a este régimen quimioterapéutico, los oncólogos están notando que un lugar en el que los pacientes fallan es con las metástasis en el sistema nervioso central. Desafortunadamente, no hay ninguna quimioterapia estándar que sea de ayuda en esta situación.

Se estima que más de 100.000 hombres serán diagnosticados con cáncer de próstata este año, y más de 30.000 pacientes morirán debido a la enfermedad. Los sitios más habituales de metástasis en pacientes con cáncer de próstata son el hueso y los nódulos linfáticos. Las metástasis óseas son particularmente molestas, puesto que pueden crear un dolor intenso para el paciente. El tratamiento actual para el cáncer de próstata metastásico incluye el tratamiento con flutamida, leuprolida, dietilestilbestrol, y otras manipulaciones hormonales, así como quimioterapia (doxorubicina, fosfato de estramustina, vinblastina, suramina, cisplatino, y otros). Desafortunadamente, ninguno de estos agentes son consistentemente de ayuda en la enfermedad. Además, puesto que los pacientes con cáncer de próstata viven más tiempo con su cáncer, muy probablemente desarrollarán una mayor incidencia de metástasis en el sistema nervioso central (incluyendo la médula espinal).

En general, puesto que los pacientes están viviendo más tiempo con las neoplasias habituales tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata y una variedad de otras neoplasias (debido al control de su enfermedad sistémica con cirugía, terapia de radiación y quimioterapia), los oncólogos están notando que se está desarrollando una mayor incidencia de tumores metastásicos en el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro. Esto es debido probablemente a que la mayoría de la quimioterapia actualmente disponible no atraviesa la barrera hematoencefálica. Cuando el paciente (que tiene su tumor controlado en sitios fuera del cerebro) desarrolla metástasis cerebral, es una situación muy difícil. Las opciones para ese paciente están limitadas habitualmente a cirugía para una metástasis solitaria, y/o terapia de radiación. Sin embargo, después de que esas modalidades fracasan, el paciente habitualmente no tiene otras opciones.

Para cada una de las indicaciones anteriores (tumores cerebrales primarios y metástasis al cerebro desde otros tumores habituales tales como cánceres de mama, pulmón, vejiga y próstata), existe una tremenda necesidad de un tratamiento más eficaz y/o métodos para mejorar la calidad de vida del paciente.

2.6. Arsénico y sus usos médicos

Durante mucho tiempo se ha considerado al arsénico tanto un veneno como un fármaco, tanto en la práctica de la medicina occidental como de la medicina china. En las postrimerías del siglo diecinueve, el arsénico se usó con frecuencia en occidente en intentos para tratar enfermedades de la sangre. En 1978 se publicó que el tratamiento de un paciente leucémico con disolución de Fowler (una disolución de arsenito de potasio) disminuyó notablemente el recuento de glóbulos blancos (Cutler y Bradford, *Am. J. Med. Sci.*, enero de 1878, 81-84). En 1931, Forkner y Scott describieron otros intereses en el uso de la disolución de Fowler como agente paliativo para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (LMC) (*J. Am. Med. Assoc.*, 1931, iii, 97), y posteriormente fueron confirmados por Stephens y Lawrence en 1936 (*Ann. Intern. Med.*, 9, 1488-1502). La disolución de Fowler se administró típicamente en forma oral a pacientes leucémicos como una disolución hasta que el nivel de glóbulos blancos hubo bajado hasta un nivel aceptable, o hasta que se desarrollaron toxicidades (tales como queratosis dérmicas e hiperpigmentación), aunque los pacientes disfrutaron de períodos variables de remisión. En la década de 1960, la disolución de Fowler todavía se usó ocasionalmente en intentos para tratar la LMC; sin embargo, la mayoría

de los pacientes con LMC fueron tratados con otros agentes quimioterapéuticos, tales como busulfano y/o radioterapia (Monfardini y col., Cancer, 1973, 31:492-501).

Paradójicamente, uno de los efectos de la exposición al arsénico que se reconoce desde hace más tiempo, tanto si la fuente es medioambiental o medicinal, es el cáncer de piel (Hutchinson, 1888, Trans. Path. Soc. Lond., 39:352; Neubauer, 1947, Br. J. Cancer, 1:192). Incluso hubo datos epidemiológicos que sugerían que el uso de la disolución de Fowler durante largos períodos de tiempo podría conducir a una incidencia aumentada de cáncer en localizaciones internas (Cuzick y col., Br. J. Cancer, 1982, 45:904-911; Kaspar y col., J. Am. Med. Assoc., 1984, 252:3407-3408). La carcinogenicidad del arsénico se ha demostrado desde entonces por el hecho de que el arsénico es capaz de inducir aberraciones cromosómicas, amplificación génica, intercambios entre cromátidas hermanas y transformación celular. (Véase, *por ejemplo*, Lee y col., 1988, Science, 241:79-81; y Germolec y col., Toxicol. Applied Pharmacol., 1996, 141:308-318). Debido al conocido efecto carcinogénico del arsénico, su único uso terapéutico en seres humanos en la medicina occidental actual es en el tratamiento de enfermedades tropicales, tales como la tripanosomiasis africana, (el melarsoprol, o Arsobal® de Rhône Poulenc Rorer, Collegeville, PA; véase Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª edición, capítulo 66, 1659-1662, 1997).

En medicina china tradicional, la pasta de ácido arsenioso o de trióxido de arsénico se ha usado para tratar enfermedades de la médula dentaria, la psoriasis, la sífilis y la reumatosis (Chen y col., 1995, en Manual of Clinical Drugs, Shanghai, China, Instituto de Experiencias y Tecnología de Shanghai, pág. 830). En la década de 1970, el trióxido de arsénico se había aplicado experimentalmente para tratar la leucemia promielocítica aguda (LPA) en China (comentado por Mervis, 1996, Science, 273:578). La eficacia clínica del trióxido de arsénico se ha reinvestigado recientemente en 14 de 15 pacientes con LPA refractaria, donde se publicó que el uso de una dosis intravenosa de 10 mg/día durante 4-9 semanas daba como resultado la remisión morfológica completa sin la supresión asociada de la médula ósea (Shen y col., 1997, Blood, 89:3354-3360). También se ha dado a conocer que el trióxido de arsénico induce la apoptosis (muerte celular programada) *in vitro* en células NB4, una línea celular de LPA, y que la apoptosis estaba aparentemente asociada con una regulación negativa del oncogén bcl-2, y con la redistribución intracelular de la proteína quimérica PML/RAR α que son exclusivas de las células de LPA (Chen y col., 1996, Blood, 88:1052-1061); Audrey col., 1996, Exp. Cell Res. 229:253-260). De manera similar, se ha informado que el melarsoprol induce la apoptosis en líneas celulares representativas de la leucemia crónica de células B (Konig y col., 1997, Blood 90:562-570). Actualmente no está claro si se induce la apoptosis en pacientes con LPA, pero se cree que es uno de los posibles mecanismos de los efectos terapéuticos de ciertos compuestos de arsénico.

Aunque es bien sabido que el arsénico es tanto un veneno como un agente carcinogénico, ha habido muchos informes referidos al uso del arsénico en tratamientos médicos.

Además, del análisis anterior, debería quedar claro que existe una plétora de diferentes tipos de cánceres, cada uno de los cuales requiere un protocolo de tratamiento único. De este modo, resulta extremadamente deseable el desarrollo de un agente anticanceroso de amplio espectro. Como mínimo, se necesitan agentes anticancerosos eficaces adicionales para ser añadidos al arsenal contra el cáncer.

3. SUMARIO DE LA INVENCION

A pesar de los informes conflictivos en la técnica en lo que se refiere a beneficios y riesgos de la administración de arsénico a pacientes, los solicitantes han descubierto que el trióxido de arsénico tiene amplia aplicabilidad en el tratamiento de diversos cánceres.

La presente invención engloba trióxido de arsénico para uso en el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón.

Según la presente invención, el trióxido de arsénico se puede usar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos (incluyendo agentes quimioterápicos, agentes radioprotectores y agentes radioterapéuticos) o técnicas para mejorar la calidad de vida del paciente o bien para tratar la enfermedad neoplásica primaria. Por ejemplo, el trióxido de arsénico se puede usar antes, durante o después de la administración de uno o más agentes antitumorales conocidos, incluyendo pero sin limitarse a compuestos de mostaza, mostaza de nitrógeno, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, floxuridina, metotrexato, vincristina, vinblastina, taxol, etopósido, tenipósido, dactinomina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, cisplatino, carboplatino, fosfato de estramustina, hidroxurea, BCNU, procarbazona, VM-26 (vumon), interferones y ácido todo trans retinoico (ATTR), (véase, *por ejemplo*, las Physician Desk References 1997). Además, los compuestos de arsénico se pueden usar antes, durante o después del tratamiento de radiación. Para el tratamiento de individuos infectados por el VIH, el trióxido de arsénico se puede usar solo o en combinación con AZT, ddI, ddA, ddC, d4T, 3TC y otros agentes antivirales conocidos.

En una realización particular, el trióxido de arsénico se usa en un método para tratar cáncer de mama, de pulmón, de colon, ovárico, renal, de vejiga y de próstata administrando una cantidad eficaz de trióxido de arsénico, solo o en combinación con otros agentes antineoplásicos o técnicas terapéuticas, incluyendo radioterapia y cirugía.

Sin quedar limitado por teoría alguna, los inventores creen que el trióxido de arsénico de la invención puede tener uno o más mecanismos de acción en relación con los métodos descritos aquí. Por ejemplo, el trióxido de arsénico puede actuar como un análogo de fósforo que interfiere con los sucesos de fosforilación que se producen en la transducción de señales implicada en la apoptosis. El arsénico también puede actuar como un inhibidor de la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos, limitando de ese modo el flujo sanguíneo hacia metástasis, tumores y masas celulares preneoplásicas en proliferación. Se sabe bien que si un tumor no es invadido por capilares sanguíneos debería de depender de la difusión de nutrientes procedentes de su entorno, y no puede aumentar más allá de un determinado tamaño. El arsénico también puede funcionar como agente de diferenciación que hace que las células cancerígenas y/o preneoplásicas en división que presentan un fenotipo no diferenciado o subdiferenciado se desarrollen en células diferenciadas de manera terminal y mueran tras un número finito de divisiones celulares. Finalmente, el arsénico también puede actuar para sensibilizar las células cancerígenas a la radiación y/o quimioterapia. De este modo, el trióxido de arsénico de la invención se describe como útil contra una variedad de cánceres.

Las composiciones particulares de la invención y sus propiedades se describen en las secciones y subsecciones que siguen.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A-1I. Curvas de respuesta frente a la dosis que muestran el porcentaje de crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer tras la exposición continua a 10^{-5} hasta 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 2 días. Figura 1A. Líneas celulares leucémicas CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR. Figura 1B. Líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico A549/ATCC, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-8322M, NCI-H460, NCI-H522. Figura 1C. Líneas celulares de cáncer de colon COLO 205, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW620. Figura 1D. Líneas celulares de cáncer del SNC SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251. Figura 1E. Líneas celulares de melanoma LOX 1MV1, MALME-3M, M14, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62. Figura 1F. Líneas celulares de cáncer de ovario IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3. Figura 1G. Líneas celulares de cáncer renal A498, CAKI-1, RXE 393, SN12C, TX-10, UO-31. Figura 1H. Líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, DU-145. Figura 1I. Líneas celulares de cáncer de mama MCF7, NCI/ADR-RES, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D.

Figura 2. Gráficos de medias que muestran los patrones de selectividad en cada uno de los principales parámetros de respuesta para todas las líneas celulares ensayadas tras la exposición continua a 10^{-5} hasta 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 2 días.

Figura 3A-3I. Curvas de respuesta frente a la dosis que muestran el porcentaje de crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer tras la exposición continua a 10^{-5} hasta 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 6 días. Figura 3A. Líneas celulares leucémicas CCRF-CEM, K-562, MOLT-4, RPMI-8226. Figura 3B. Líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522. Figura 3C. Líneas celulares de cáncer de colon COLO 205, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW-620. Figura 3D. Líneas celulares de cáncer del SNC SF-268, SF-295, SF-539, SNB-75, U251. Figura 3E. Líneas celulares de melanoma LOX IMVI, MALMI-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62. Figura 3F. Líneas celulares de cáncer de ovario IGROVI, OVCAR-3, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3. Figura 3G. Líneas celulares de cáncer renal 786-0, A498, CAKI-1, RXF 393, S12C, TK-10. Figura 3H. Líneas celulares de cáncer de próstata DU-145. Figura 3I. Líneas celulares de cáncer de mama MCF7, NCI/ADR-RIS, MDA-MB-231/ATCC, HS 578T, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D.

Figura 4. Gráficos de medias que muestran los patrones de selectividad en cada uno de los principales parámetros de respuesta para todas las líneas celulares ensayadas tras la exposición continua a 10^{-5} hasta 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 6 días.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen aquí métodos y composiciones para el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón. La invención se basa, en parte, en un régimen de dosificación para la administración de trióxido de arsénico. La invención también se basa, en parte, en la potencia del trióxido de arsénico de la invención frente a un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón.

La invención también incluye un método para tratar un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero una dosis terapéuticamente eficaz y no letal de uno o más compuestos de arsénico.

En general, el experto en la técnica reconocerá que la forma de trióxido de arsénico a usar debería de ser terapéuticamente eficaz sin que se presente toxicidad no razonable. La toxicidad depende de la dosis, de la forma de dosificación, del modo de administración y de la frecuencia de las dosis.

Como se usa aquí, "trióxido de arsénico" se refiere a una forma farmacéuticamente aceptable de trióxido

de arsénico, incluyendo sales, disoluciones, complejos, quelatos y compuestos orgánicos e inorgánicos que incorporan arsénico. Los compuestos de arsénico de la presente invención se pueden sintetizar o se pueden adquirir comercialmente. Por ejemplo, los compuestos se pueden preparar a partir de técnicas químicas bien conocidas. (Véase, por ejemplo, Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4 ed., volumen 3, págs. 633-655, John Wiley & Sons).

En una realización, el trióxido de arsénico de la invención se disuelve en una disolución acuosa de hidróxido de sodio, con el pH ajustado a un intervalo fisiológicamente aceptable, por ejemplo un pH de aproximadamente 6-8.

Según la presente invención, se puede usar cualquier modo de administración adecuado, incluyendo pero sin limitarse a la administración parenteral, tal como la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular e intratecal; también puede usarse la administración oral, intranasal, rectal o vaginal; directamente dentro del tumor; parches transdérmicos; dispositivos de implantes (en particular, para liberación lenta); finalmente, puede usarse la administración tópica. El modo de administración variará según la enfermedad a tratar.

Las composiciones farmacéuticas a usar pueden estar en forma de disoluciones estériles fisiológicamente aceptables (acuosas u orgánicas), suspensiones coloidales, cremas, ungüentos, pastas, cápsulas, comprimidos oblongos, comprimidos y píldoras. Las composiciones farmacéuticas que comprenden trióxido de arsénico de la invención pueden estar contenidas en recipientes y/o ampollas de vidrio sellados, estériles. Además, el ingrediente activo puede estar microencapsulado, encapsulado en un liposoma, noisoma o lipoespuma, solo o en combinación con anticuerpos dirigidos. Debe reconocerse que también están incluidas las formas de liberación retardada, lenta o sostenida.

El trióxido de arsénico de la presente invención se puede usar frente a tumores de la mama, colon, ovarios, riñones, pulmón, vejiga y próstata.

Más específicamente, el trióxido de arsénico se puede usar para tratar

tumores del tubo digestivo:

- carcinoma de células escamosas del esófago
- adenocarcinoma del esófago
- carcinoma colorrectal (cáncer de colon)
- carcinoma gástrico (cáncer de estómago)

tumores del aparato respiratorio:

- carcinoma broncogénico
- carcinoma microcítico
- carcinoma de células grandes

tumores del aparato urogenital:

- carcinomas de células transicionales de vejiga
- carcinoma de células escamosas de vejiga
- carcinoma de próstata
- carcinoma de cuello uterino

tumores de mama.

Como se usan aquí, las expresiones “un método para tratar cáncer primario o metastático de mama, pulmón, vejiga o próstata” y “un método para tratar metástasis de cáncer de mama, pulmón, vejiga o próstata” significan que la enfermedad y los síntomas asociados con la enfermedad se alivian, reducen, curan o se llevan a un estado de remisión. Además, la expresión “un método para tratar metástasis de cáncer de mama, pulmón, vejiga o próstata” significa que los tumores metastáticos y los síntomas asociados con la enfermedad se alivian, reducen, curan o se llevan a un estado de remisión.

El término “refractario”, cuando se usa aquí, significa que las neoplasias son generalmente resistentes al tratamiento o curación. El término “refractario”, cuando se usa en los términos anteriores, significa que las neoplasias que son generalmente resistentes al tratamiento o curación se alivian, reducen, curan o se llevan a un estado de remisión.

Como se usa aquí, las expresiones “un agente terapéutico”, “régimen terapéutico”, “radioprotector”, “quimioterapéutico” significan fármacos y terapias farmacéuticas convencionales, incluyendo vacunas, para tratar cáncer, infecciones víricas, y otras neoplasias, que son conocidos por los expertos en la técnica. Los agentes “radioterapéuticos” son bien conocidos en la técnica.

5 Como se usa aquí, “un método para tratar cáncer”, o “un método para tratar tumores sólidos”, o “un método para tratar enfermedades neoplásicas”, significa que la enfermedad y los síntomas asociados con la enfermedad se alivian, reducen, curan o se llevan a un estado de remisión. Además, se inhibe el crecimiento tumoral y/o se reduce el tamaño tumoral.

10 Como se usa aquí, célula “preneoplásica” se refiere a una célula que está en transición desde una forma normal a una forma neoplásica; y los signos morfológicos, cada vez más respaldados por estudios biológicos moleculares, indican que la preneoplasia progresa a través de múltiples etapas. El crecimiento celular no neoplásico consiste habitualmente en hiperplasia, metaplasia, o más particularmente displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anormal, véase Robbins y Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, pág. 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada que implica un aumento del número de células en un tejido u órgano, sin alteración significativa en la estructura o función. Sólo como ejemplo, la hiperplasia endometrial frecuentemente precede al cáncer endometrial. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en el que un tipo de célula adulta sustituye a otro tipo de célula adulta o totalmente diferenciada. La metaplasia puede presentarse en células epiteliales o del tejido conjuntivo. La metaplasia atípica implica un epitelio algo desordenado metaplásico. La displasia es frecuentemente un predecesor del cáncer, y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada de crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación de la arquitectura de las células. Las células displásicas tienen con frecuencia núcleos anormalmente grandes, profundamente teñidos, y exhiben pleomorfismo. La displasia se presenta de forma característica donde existe irritación o inflamación crónica, y se encuentra frecuentemente en el cuello uterino, los conductos respiratorios, la cavidad oral y la vesícula biliar. Aunque las lesiones preneoplásicas pueden progresar a neoplasia, también pueden permanecer estables durante largos períodos y pueden incluso sufrir regresión, particularmente si el agente incitador se elimina o si la lesión sucumbe a un ataque inmunológico por su hospedante.

20 Los regímenes terapéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar con otros potenciadores de la respuesta inmunitaria, o con modificadores de la respuesta biológica, incluyendo, pero sin limitarse a, las citocinas IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF, u otros inmunoestimulantes/inmunomoduladores. De acuerdo con este aspecto de la invención, el trióxido de arsénico se administra en terapia de combinación con uno o más de estos agentes.

5.1. Formulación

35 El trióxido de arsénico de la invención se puede formular en preparaciones farmacéuticas para la administración a mamíferos para el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente compatible se pueden preparar, empaquetar, etiquetar para el tratamiento de y se pueden usar para el tratamiento del tumor indicado.

40 Si el complejo es soluble en agua, entonces se puede formular en un tampón adecuado, por ejemplo disolución salina tamponada con fosfato u otras disoluciones fisiológicamente compatibles. Como alternativa, si el complejo resultante tiene mala solubilidad en disolventes acuosos, entonces se puede formular con un tensioactivo no iónico tal como Tween, polietilenglicol o glicerina. De este modo, el trióxido de arsénico y sus solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para la administración por inhalación o insuflación (a través de la boca o de la nariz) u oral, bucal, parenteral, tópica, dérmica, vaginal, por medio de dispositivos de administración del fármaco, por ejemplo, material poroso o viscoso tal como lipoespuma, administración rectal o, en el caso de tumores, inyectado directamente en un tumor sólido.

50 Para la administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo disoluciones, jarabes o suspensiones, o se puede presentar en forma de un fármaco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (*por ejemplo*, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles); agentes emulsionantes (*por ejemplo*, lecitina, o goma arábiga); vehículos no acuosos (*por ejemplo*, aceite de almendras, ésteres grasos, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (*por ejemplo*, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo, o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden tener la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (*por ejemplo*, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (*por ejemplo*, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (*por ejemplo*, estearato de magnesio, talco o sílice); agentes disgregantes (*por ejemplo*, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (*por ejemplo*, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden estar recubiertos por métodos muy conocidos en la técnica.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas, formuladas de una manera convencional.

5 Para la administración por inhalación, el trióxido de arsénico para uso según la presente invención se administra convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol en envases presurizados o en forma de nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, *por ejemplo* diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, *por ejemplo*, gelatina para uso en un inhalador o en un insuflador, que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

10 El trióxido de arsénico se puede formular para administración parenteral mediante inyección, *por ejemplo*, mediante una inyección de bolo o mediante infusión continua. Tales formulaciones son estériles. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de monodosis, *por ejemplo* en ampollas o en envases de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones, en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes favorecedores de la formulación tales como agentes de suspensión, agentes estabilizantes y/o agentes dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, *por ejemplo* agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

15 El trióxido de arsénico también se puede formular en composiciones para administración rectal, tales como supositorios o enemas de retención, *por ejemplo*, que contienen bases para supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

20 Además de las formulaciones descritas anteriormente, el trióxido de arsénico también se puede formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por medio de implantes (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, el trióxido de arsénico se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados ligeramente solubles, por ejemplo como una sal ligeramente soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos muy conocidos de vehículos o portadores de administración para fármacos hidrófilos.

25 Las composiciones se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede con-tener una o más formas de monodosis que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender por ejemplo una lámina de metal o de plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

30 La invención también se refiere a kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Tales kits comprenden, en uno o más envases, cantidades terapéuticamente eficaces de trióxido de arsénico en forma farmacéuticamente aceptable. El trióxido de arsénico contenido en un vial de un kit puede estar en forma de una disolución farmacéuticamente aceptable, *por ejemplo*, en combinación con disolución salina estéril, disolución de dextrosa, o una disolución tamponada, o en otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, el complejo puede estar liofilizado o desecado; en este caso, el kit también comprende de manera opcional en un envase una disolución farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, disolución salina, disolución de dextrosa, etc.), preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo para formar una disolución para fines de inyección.

35 En otro ejemplo, un kit comprende además una aguja o jeringa, preferiblemente envasada en una forma estéril, para inyectar el complejo, y/o una almohadilla empaquetada con alcohol. Se incluyen opcionalmente instrucciones para la administración del trióxido de arsénico por parte del médico o del paciente.

40 La magnitud de una dosis terapéutica de un trióxido de arsénico en el manejo agudo o crónico de un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón variará con la gravedad de la afección a tratar y con la vía de administración. La dosis, y quizá la frecuencia de la dosis, variará también según la edad, el peso corporal, el estado y la respuesta del paciente individual. En general, los intervalos de dosis diarias totales para las afecciones descritas aquí oscilan generalmente desde alrededor de 10 μg hasta alrededor de 200 mg, administrados en dosis divididas por vía parenteral u oral o tópica. Una dosis diaria total preferida es desde alrededor de 0,5 mg hasta alrededor de 70 mg del ingrediente activo.

45 Se pueden mantener niveles deseables en sangre por medio de una infusión continua de trióxido de arsénico, de una manera determinada por los niveles plasmáticos. Debe destacarse que el médico sabrá cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar el tratamiento a una dosificación más baja debido a toxicidad, o por disfunciones de la médula ósea, hígado o riñón. Y a la inversa, el médico sabrá también cómo y cuándo ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

Nuevamente, se puede emplear cualquier vía adecuada de administración para administrar al paciente una dosis eficaz de trióxido de arsénico. Por ejemplo, se pueden emplear las vías oral, rectal, vaginal, transdérmica, parenteral (subcutánea, intramuscular, intratecal). Las formas de dosificación incluyen comprimidos, trociscos, sellos, dispersiones, suspensiones, disoluciones, cápsulas, parches y similares. (Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden trióxido de arsénico como el ingrediente activo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y pueden también contener un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos, por ejemplo antivirales. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de ácidos y bases no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos y bases inorgánicos y orgánicos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones adecuadas para las vías oral, rectal, mucosal, transdérmica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intratecal e intravenosa), aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección a tratar.

En el caso en el que se emplea una composición para inyección o infusión intravenosa, un intervalo de dosificación adecuado para uso es, por ejemplo, desde alrededor de 0,5 mg hasta alrededor de 150 mg de dosis diaria total.

Además, el vehículo del trióxido de arsénico se podría administrar a través de matrices cargadas o no cargadas usadas como dispositivos de administración del fármaco tales como membranas de acetato de celulosa, también a través de sistemas de administración dirigidos tales como liposomas fusogénicos unidos a anticuerpos o a antígenos específicos.

En el uso práctico, el trióxido de arsénico se puede combinar como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico según técnicas convencionales de formación de compuestos farmacéuticos. El vehículo puede tomar una amplia diversidad de formas, dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo oral o parenteral (incluyendo comprimidos, cápsulas, polvos, inyecciones o infusiones intravenosas). En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación oral, se puede usar cualquiera de los medios farmacéuticos usuales, por ejemplo agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromáticos, conservantes, colorantes, y similares; en el caso de las preparaciones orales líquidas, por ejemplo suspensiones, disoluciones, elixires, liposomas y aerosoles, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, y similares en el caso de preparaciones orales sólidas, por ejemplo polvos, cápsulas y comprimidos. En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación parenteral, tal como inyección o infusión intravenosa, se pueden usar medios farmacéuticos similares, por ejemplo agua, glicoles, aceites, tampones, azúcar, conservantes y similares, conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de tales composiciones parenterales incluyen dextrosa al 5% p/v, disolución salina normal u otras disoluciones. La dosis total del trióxido de arsénico se puede administrar en un vial de fluido intravenoso, por ejemplo, que varíe desde alrededor de 2 ml hasta alrededor de 2000 ml. El volumen de fluido de dilución variará según la dosis total administrada.

5.2. Cánceres diana

Los cánceres que se pueden tratar mediante los métodos descritos incluyen un tumor sólido seleccionado del grupo de cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón.

6. EJEMPLOS DE REFERENCIA

Las siguientes subsecciones describen los ensayos *in vitro* de una composición farmacéutica que comprende trióxido de arsénico usando un panel de líneas celulares de cáncer usadas por el National Cancer Institute (NCI). Los resultados demuestran que el trióxido de arsénico es eficaz inhibiendo el crecimiento *in vitro* de una gran variedad de células leucémicas y células cancerosas.

6.1. MÉTODOS Y MATERIALES

Se ensayó trióxido de arsénico (1 mg/ml, 10 mg/ampolla, fabricado por Taylor Pharmaceuticals, Decatur, Illinois) a cinco concentraciones, cada una diluida 10 veces, es decir, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$.

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo incubando las células de ensayo en presencia de la concentración indicada de trióxido de arsénico en condiciones de cultivo convencionales, durante un período de tiempo determinado, seguido de un ensayo de proteína sulfurodamina B (SRB) para estimar la viabilidad o el crecimiento celular. Las líneas celulares se organizan en subpaneles según el origen de las líneas celulares, por ejemplo leucemia, cáncer de mama, etc. Una descripción de las líneas celulares y el método de ensayo se describe en Monk y col. (1997, Anticancer Drug Des. 12:533-541) y Weinstein y col., (1997, Science 275:343-9).

A continuación se describen los procedimientos de análisis y presentación de datos.

La medida de un efecto se expresa en Porcentaje de Crecimiento (PC). El efecto medido del compuesto sobre una línea celular se calcula según una u otra de las siguientes dos expresiones:

Si $(OD_{\text{ensayo}} \text{ Media} - OD_{\text{cero}} \text{ Media}) \geq 0$, entonces

$$PC = 100 \times (OD_{\text{ensayo}} \text{ Media} - OD_{\text{cero}} \text{ Media}) / (OD_{\text{control}} \text{ Media} - OD_{\text{cero}} \text{ Media})$$

5 Si $(OD_{\text{ensayo}} \text{ Media} - OD_{\text{cero}} \text{ Media}) < 0$, entonces

$$PC = 100 \times (OD_{\text{ensayo}} \text{ Media} - OD_{\text{cero}} \text{ Media}) / OD_{\text{cero}} \text{ Media}$$

en las que:

OD_{cero} Media = la media de las medidas de densidad óptica del color derivado mediante SRB justo antes de la exposición de las células a los compuestos de ensayo;

10 OD_{ensayo} Media = la media de las medidas de densidad óptica del color derivado mediante SRB tras la exposición de las células al compuesto de ensayo durante un período designado de tiempo; y

15 OD_{control} Media = la media de las medidas de densidad óptica del color derivado mediante SRB tras la falta de exposición de las células al compuesto de ensayo durante un período designado de tiempo.

20 Las Tablas 1 y 2 presentan los datos experimentales recogidos frente a cada línea celular. Las dos primeras columnas describen el subpanel (por ejemplo, leucemia) y la línea celular (por ejemplo, CCRF-CEM) implicados. Las dos columnas siguientes presentan la OD_{cero} Media y OD_{control} Media; las cinco columnas siguientes presentan la OD_{ensayo} Media para cada una de las cinco concentraciones diferentes. Cada concentración se expresa como el log₁₀ (molar o µg/ml). Las cinco columnas siguientes presentan los PC calculados para cada concentración. Los parámetros de respuesta IC50 (concentración que provoca inhibición del 50% del crecimiento celular), ITC (concentración que provoca la inhibición total del crecimiento) y CL50 (concentración que provoca la muerte del 50% de las células) son valores interpolados que representan las concentraciones a las que el PC es +50, 0 y -50, respectivamente. Algunas veces, estos parámetros no se pueden obtener por interpolación. Si, por ejemplo, todos los PC en una fila dada exceden +50, entonces ninguno de los tres parámetros se puede obtener por interpolación. En tal caso, el valor dado para cada parámetro de respuesta es la concentración más alta ensayada, y está precedido por un signo ">". Esta práctica se extiende de manera similar a las otras situaciones posibles, donde un parámetro de respuesta no se puede obtener por interpolación.

30 Se crea una curva de respuesta frente a la dosis (véanse Figuras 1A-11 y 3A-3I) para el conjunto de datos representando gráficamente los PC frente al log₁₀ de la concentración correspondiente para cada línea celular. Las curvas de las líneas celulares se agrupan por subpanel. Se proporcionan líneas horizontales en el valor de PC de +50, 0 y -50. Las concentraciones correspondientes a los puntos en los que las curvas cruzan estas líneas son IC50, ITC y CL50, respectivamente.

35 Un gráfico de medias (Figuras 2 y 4) facilita el barrido visual de los datos para los patrones potenciales de selectividad para líneas celulares particulares o para subpaneles particulares con respecto a un parámetro de respuesta seleccionado. Se pueden presentar diferencias en patrones de selectividad aparentes para el mismo compuesto frente a las mismas líneas celulares cuando se comparan diferentes parámetros. La página de gráficos de medias del paquete de datos muestra los gráficos de medias en cada uno de los parámetros de respuesta principales: IC50, ITC y CL50. Las barras que se extienden hacia la derecha representan sensibilidad de la línea celular al agente de ensayo en exceso de la sensibilidad promedio de todas las líneas celulares ensayadas. Como la escala de barras es logarítmica, una barra de 2 unidades hacia la derecha implica que el compuesto alcanzó el parámetro de respuesta (por ejemplo, IC50) para la línea celular a una concentración de una centésima de la concentración media requerida para todas las líneas celulares, y de este modo la línea celular es inusualmente sensible a ese compuesto. Las barras que se extienden hacia la izquierda implican de manera correspondiente menos sensibilidad que la media. Si para un fármaco y línea celular particulares no fue posible determinar por interpolación el parámetro de respuesta deseado, la longitud de la barra mostrada es la concentración más alta ensayada (y el log₁₀ presentado del parámetro de respuesta estará precedido por un ">") o la concentración más baja ensayada (y el log₁₀ presentado estará precedido por un "<").

50 Los valores en cualquier límite (> o <) se calculan también en la media usada para el gráfico de medias. Por lo tanto, la media usada en el gráfico de medias puede no ser la media real para la IC50 por ejemplo. Por esta razón, este valor se denomina como el MG_MID (por punto medio del gráfico de medias).

6.2. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de dos conjuntos de ensayos. En el primer conjunto, las células de 56 diferentes líneas celulares de cáncer se expusieron a cinco concentraciones de trióxido de arsénico

continuamente durante dos días antes de llevar a cabo el ensayo de SRB. En el segundo conjunto, las células de 50 líneas celulares diferentes (un subconjunto de las primeras 56 líneas celulares, más la línea celular de cáncer renal 786-0) se expusieron continuamente durante seis días antes del ensayo de SRB.

TABLA 1

	Tiempo cero	Ctrl	Log10 Concentración							Porcentaje de crecimiento										
			Densidades ópticas medias							IC50	ITC	CL50								
			-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	8,9	7,9				6,9	5,9	4,9					
Leucemia																				
CCRF-CEM	0,300	1,155	1,203	1,195	1,134	0,704	0,285	106	105	98	47	-5	1,11E-06	1,00E-05	>1,26E-05					
HL-60(TB)	0,233	0,530	0,533	0,507	0,535	0,499	0,213	101	92	102	90	-9	3,19E-06	1,03E-05	>1,26E-05					
K-562	0,209	1,416	1,387	1,431	1,418	1,124	0,199	98	101	100	76	-5	2,63E-06	1,10E-05	>1,26E-05					
MOLT-4	0,134	0,438	0,465	0,454	0,454	0,368	0,146	109	105	105	77	4	2,96E-06	>1,26E-05	>1,26E-05					
RPMI-8226	0,257	0,893	0,868	0,848	0,813	0,670	0,204	96	93	87	65	-21	1,88E-06	7,23E-06	>1,26E-05					
SR	0,158	0,457	0,454	0,425	0,457	0,338	0,111	99	89	100	60	-30	1,63E-06	5,85E-06	>1,26E-05					
Cáncer de pulmón no microcítico																				
A549/ATCC	0,015	0,477	0,479	0,486	0,476	0,516	0,336	100	102	100	108	69	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05					
EXVX	0,342	0,736	0,809	0,849	0,841	0,853	0,385	119	129	127	130	11	5,91E-06	>1,26E-05	>1,26E-05					
HOP-62	0,335	1,109	1,088	1,099	1,113	1,086	0,605	97	99	100	97	35	7,18E-06	>1,26E-05	>1,26E-05					
HOP-92	0,505	1,694	1,554	1,603	1,477	1,381	0,873	88	92	82	74	31	4,50E-06	>1,26E-05	>1,26E-05					
NCH226	0,560	0,932	0,967	0,918	0,967	0,967	0,904	109	96	109	109	92	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05					
NCH23	0,648	1,622	1,769	1,822	1,880	1,635	1,215	115	121	127	101	58	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05					

NCI-8322M	0,382	0,997	1,103	1,036	0,976	0,992	0,755	117	106	97	99	61	>1,26E-05	>1,26E-05
NCI-H460	0,296	1,235	1,132	1,186	1,234	1,157	0,757	89	95	100	92	49	>1,26E-05	>1,26E-05
NCI-H522	0,478	1,138	1,332	1,135	1,189	0,892	0,378	129	100	108	63	-21	7,08E-06	>1,26E-05
Cáncer de colon														
COLO 205	0,328	1,394	1,425	1,414	1,576	1,434	0,935	103	102	117	104	37	>1,26E-05	>1,26E-05
HCT-116	0,301	1,574	1,508	1,480	1,488	1,391	0,685	95	93	93	86	30	>1,26E-05	>1,26E-05
HCT-15	0,219	1,623	1,800	1,627	1,673	1,522	0,504	113	100	104	93	20	>1,26E-05	>1,26E-05
HT29	0,095	0,578	0,637	0,599	0,580	0,479	0,169	112	104	100	80	15	>1,26E-05	>1,26E-05
Cáncer del SNC														
KM12	0,189	0,741	0,744	0,728	0,777	0,737	0,567	101	98	106	99	68	>1,26E-05	>1,26E-05
SW-620	0,153	0,886	0,898	0,868	0,857	0,779	0,267	102	98	96	85	16	>1,26E-05	>1,26E-05
Cáncer del SNC														
SF-268	0,203	0,767	0,821	0,736	0,815	0,767	0,334	110	94	108	100	23	>1,26E-05	>1,26E-05
SF-295	0,249	1,007	0,931	0,978	0,938	0,938	0,639	93	96	91	91	51	>1,26E-05	>1,26E-05
SF-539	0,132	0,462	0,491	0,516	0,506	0,435	0,110	109	117	113	92	-17	8,85E-06	>1,26E-05
SNB-19	0,176	0,905	0,857	0,880	0,887	0,883	0,437	93	97	98	97	36	>1,26E-05	>1,26E-05
SNB-75	0,501	1,051	0,925	1,049	1,134	0,703	0,438	77	100	115	37	-13	6,98E-06	>1,26E-05
U251	0,192	0,799	0,789	0,792	0,803	0,680	0,061	98	99	101	80	-68	4,37E-06	9,47E-06
Melanoma														

LOX IMVI	0,173	1,304	1,175	1,170	0,974	0,997	0,319	89	88	71	73	13	3,03E-06	>1,26E-05
MALME-3M	0,476	0,859	1,006	0,949	0,868	0,819	0,275	138	123	102	90	-42	2,51E-06	>1,26E-05
M14	0,123	0,613	0,602	0,635	0,592	0,549	0,136	98	105	96	87	3	3,45E-06	>1,26E-05
SK-MEL-2	0,388	0,704	0,746	0,714	0,735	0,676	0,323	113	103	110	91	-17	3,03E-06	>1,26E-05
SK-MEL-28	0,513	1,090	1,088	1,107	1,093	1,057	0,546	100	103	101	94	6	3,98E-06	>1,26E-05
SK-MEL-5	0,454	2,107	2,049	2,066	2,025	1,748	0,460	96	97	95	78	0	2,90E-06	>1,26E-05
UACC-257	0,596	1,142	1,149	1,128	1,165	1,078	0,814	101	97	104	88	40	7,78E-06	>1,26E-05
UACC-62	0,306	1,082	1,111	1,105	1,108	1,051	0,355	104	103	103	96	6	4,10E-06	>1,26E-05
Cáncer ovárico														
IGROV1	0,291	1,679	1,828	1,932	1,743	1,710	0,536	111	118	105	102	18	5,22E-06	>1,26E-05
OVCAR-3	0,240	1,066	1,073	1,055	1,045	0,980	0,343	101	99	97	90	12	4,10E-06	>1,26E-05
OVCAR-5	0,457	1,206	1,243	1,230	1,157	1,181	0,715	105	103	93	97	34	7,07E-06	>1,26E-05
OVCAR-8	0,173	1,340	1,250	1,245	1,159	1,107	0,495	92	92	84	80	28	4,71 E-06	>1,26E-05
SK-OV-3	0,351	0,865	0,836	0,852	0,853	0,867	0,557	94	97	98	100	40	8,59E-06	>1,26E-05
Cáncer renal														
A498	0,400	0,678	0,691	0,657	0,649	0,635	0,357	105	93	89	84	-11	2,90E-06	>1,26E-05
CAKI-1	0,372	0,942	1,058	0,960	1,103	0,819	0,325	120	103	128	78	-13	2,59E-06	>1,26E-05
RXE 393	0,743	1,243	0,860	1,114	1,290	1,077	0,776	23	74	109	67	7		>1,26E-05

SN12C	0,157	0,546	0,533	0,529	0,500	0,474	0,113	97	96	88	81	-28	2,44E-06	6,96E-06	>1,26E-05
TX-10	0,355	1,027	1,014	1,002	1,042	0,999	0,727	98	96	102	96	35	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05
UO-31	0,124	0,765	0,799	0,816	0,830	0,785	0,391	105	108	110	103	42	9,20E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
Cáncer de próstata															
PC-3	0,187	0,419	0,426	0,399	0,390	0,342	0,179	103	91	88	67	-4	2,17E-06	1,10E-05	>1,26E-05
DU-145	0,384	1,151	1,081	1,389	1,194	1,119	0,873	91	131	106	96	64	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05
Cáncer de mama															
MCF7	0,200	0,928	0,924	0,912	0,985	0,893	0,277	99	98	108	95	11	4,31E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
NCI/ADR-RES	0,328	1,386	1,576	1,376	1,425	1,298	0,801	118	99	104	92	45	9,69E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
MDA-MB-231/ATCC	0,304	0,644	0,635	0,651	0,674	0,667	0,314	97	102	109	107	3	4,43E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
HS 578T	0,369	1,255	1,338	1,296	1,219	1,300	0,742	109	105	96	105	42	9,44E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
MDA-MB-435	0,465	1,425	1,370	1,354	1,476	1,369	0,666	94	93	105	94	21	5,05E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
MDA-N	0,348	1,471	1,499	1,481	1,374	1,316	0,385	102	101	91	86	3	3,44E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
BT-549	0,735	1,762	1,910	1,865	1,847	1,599	0,998	114	110	108	84	26	4,82E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
T-47D	0,464	1,007	0,941	1,054	1,184	0,905	0,419	88	109	133	81	-10	2,78E-06	9,86E-06	>1,26E-05

5 En el primer conjunto de ensayos, según la Tabla 1 y las curvas de respuesta frente a la dosis como se muestra en la Figura 1A a 1I, el trióxido de arsénico fue eficaz reduciendo el crecimiento celular frente a prácticamente todas las líneas celulares ensayadas. En particular, las líneas celulares leucémicas, las líneas celulares de melanoma y las líneas celulares de cáncer ovárico respondieron de manera consistente, mostrando una reducción del crecimiento de más del 50%. Según el gráfico de medias como se muestra en la Figura 2, la mayoría de las líneas celulares de leucemia y melanoma, las líneas celulares de cáncer del sistema nervioso central SNB-75 y U251, las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3, las líneas celulares de cáncer renal A498, CAKI-1, SN12C y las líneas celulares de cáncer de pulmón NCI-H522, fueron especialmente sensibles (con respecto a todas las líneas celulares ensayadas) al tratamiento con trióxido de arsénico.

TABLA 2

Panel/Línea Celular	Tiempo cero	Ctrl	Log10 Concentración										CL50		
			Densidades ópticas medias					Porcentaje de crecimiento							
			-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	IC50	ITC	
Leucemia															
CCRF-CEM	0,047	3,511	3,601	3,592	3,051	0,320	0,048	103	102	87	8	0	3,68E-07	>1,26E-05	>1,261-05
K-562	0,041	3,011	3,042	2,992	3,360	2,931	0,096	101	99	112	97	2	3,941E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
MOLT-4	0,018	0,503	0,554	0,228	0,432	0,245	0,113	111	43	85	47	20	,	>1,26E-05	>1,26E-05
Cáncer de pulmón no microcítico															
RPMI-8226	0,066	1,432	1,607	1,263	1,423	0,368	0,065	113	88	99	22	-2	5,481E-07	1,091E-05	>1,26E-05
EKVX	0,030	0,682	0,573	0,601	0,628	0,414	0,014	83	88	92	59	-53	1,51E-06	4,22E-06	1,18E-05
HOP-62	0,061	1,026	1,076	0,997	1,019	0,451	0,014	105	97	99	40	-77	8,66E-07	2,781E-06	7,41E-06
HOP-92	0,115	1,292	1,455	1,834	1,319	1,229	0,079	114	146	102	95	-31	2,85E-06	7,111E-06	>1,26E-05
NCI-H226	0,094	0,498	0,504	0,458	0,489	0,348	0,164	101	90	98	63	17	2,40E-08	>1,261-05	>1,26E-05
NCI-H23	0,075	1,624	1,818	1,814	1,872	1,303	0,086	113	112	116	79	1	2,97E-06	>1,261-05	>1,26E-05
NCI-H322M	0,035	0,702	0,680	0,620	0,674	0,552	0,054	97	88	96	77	3	2,94E-06	>1,261-05	>1,26E-05
NCI-H460	0,034	2,839	2,797	2,806	2,792	2,535	0,062	99	99	98	89	1	3,50E-06	>1,261-05	>1,26E-05

NCI-H522	0,175	1,224	1,269	0,535	1,191	0,128	0,028	104	34	97	-27	-84	,	7,641-07	3,19E-06
Cáncer de colon															
COLO 205	0,022	2,351	2,308	2,026	2,283	1,404	0,024	98	86	97	59	0	1,81E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
HCT-116	0,046	3,420	3,395	3,289	3,381	3,284	1,931	99	96	99	96	56	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05
HCT-15	0,033	3,838	3,965	3,921	4,227	3,432	0,404	103	102	110	89	10	3,93E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
HT29	0,017	3,060	3,189	2,988	2,706	1,476	0,027	104	98	88	48	0	1,12E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
KM12	0,012	0,808	0,487	0,533	0,507	0,036	0,017	80	87	83	4	1	3,29E-07	>1,26E-05	>1,26E-05
SW-620	0,023	2,652	2,613	2,308	2,337	1,475	0,007	99	87	88	55	-72	1,39E-06	3,43E-06	8,50E-06
Cancer del SNC															
SF-268	0,054	0,798	0,990	0,381	0,356	0,387	-0,004	126	44	41	45	-100	1,06E-08	2,57E-06	5,69E-06
SF-295	0,031	1,324	1,284	1,279	1,244	0,659	0,010	97	97	94	49	-69	1,17E-06	3,25E-06	8,64E-06
SF-539	0,041	1,598	1,727	1,403	1,545	0,691	0,017	108	87	97	42	-59	8,91E-07	3,29E-06	1,04E-05
SNB-75	0,134	1,065	1,143	1,033	1,024	0,815	0,028	108	97	96	73	-79	1,79E-06	3,80E-06	8,08E-06
U251	0,105	2,324	2,129	2,018	1,908	0,088	-0,012	91	86	81	-17	-100	2,63E-07	8,51E-07	3,16E-06
Melanoma															
LOX IMVI	0,013	2,153	2,000	1,666	0,053	0,002	-0,001	93	77	2	-88	-100	2,90E-08	1,32E-07	4,73E-07
MALMI-3M	0,115	0,650	0,702	0,595	0,823	0,383	0,005	110	90	132	50	-96	1,26E-06	2,78E-06	6,12E-06

SK-MEL-2	0,213	0,500	0,491	0,462	0,426	0,128	,	97	87	74	-40	-100	2,06E-07	5,63E-07	1,85E-06
SK-MEL-28	0,093	2,030	2,012	1,906	1,797	0,488	,	99	94	88	20	-100	4,60E-07	1,86E-06	4,84E-06
SK-MEL-5	0,181	1,907	1,935	1,864	1,929	1,846	0,013	102	97	101	96	-93	2,22E-06	4,07E-06	7,46E-06
UACC-257	0,053	0,883	0,872	0,857	0,832	0,504	0,039	99	97	94	54	-27	1,42E-06	5,83E-06	>1,26E-05
UACC-62	0,030	1,537	1,546	1,460	1,409	0,539	0,001	101	95	92	34	-98	6,60E-07	2,27E-06	5,43E-06
Cáncer ovárico															
IGROV1	0,335	3,115	3,541	3,056	3,204	2,877	0,216	115	98	103	91	-36	2,67E-06	6,62E-06	>1,26E-05
OVCAR-3	0,081	1,153	1,047	1,128	1,124	0,482	0,001	90	98	97	37	-99	7,76E-07	2,36E-06	5,49E-06
OVCAR-5	0,038	1,404	1,433	1,460	1,478	1,287	0,028	102	104	105	91	-26	2,83E-06	7,53E-06	>1,26E-05
OVCAR-8	0,016	2,090	2,272	1,848	2,242	1,437	-0,001	109	88	107	68	-100	1,62E-06	3,21E-06	6,36E-06
SK-OV-3	0,041	1,474	1,445	1,410	1,461	1,247	0,020	98	96	99	84	-51	2,25E-06	5,27E-06	1,23E-05
Cáncer renal															
786-0	0,021	1,578	1,582	1,821	1,786	0,832	-0,003	100	116	113	52	-100	1,30E-06	2,77E-06	5,91E-06
A498	0,051	0,741	0,826	0,764	0,837	0,558	0,025	112	103	114	73	-52	1,94E-06	4,85E-06	1,22E-05
CAKI-1	0,032	1,352	1,254	1,725	1,573	0,491	0,004	93	128	117	35	-88	8,22E-07	2,43E-06	6,22E-06
RXF 393	0,198	1,515	1,327	1,301	1,727	0,909	0,017	86	84	116	54	-91	1,34E-06	2,96E-06	6,54E-06
S12C	0,024	0,956	0,882	1,141	1,113	0,829	0,013	92	120	117	86	-46	2,37E-06	5,67E-06	>1,26E-05

TK-10	0,072	1,333	1,356	1,268	1,334	1,103	0,239	102	95	100	82	13	3,66E-06	>1,26E-05
Cáncer de próstata														
DU-145	0,095	2,158	2,147	1,954	1,935	2,153	0,055	99	90	89	100	-43	2,82E-06	>1,26E-05
Cancer de mama														
MCF7	0,028	2,650	2,647	2,611	2,603	1,683	0,008	100	99	98	63	-73	1,57E-06	8,51E-06
NCI/ADR-RIS	0,050	2,304	2,075	2,253	1,951	1,319	0,072	90	98	84	56	1	1,64E-06	>1,26E-05
MDA-MB-231/ATCC	0,158	0,761	0,759	0,764	0,771	0,563	-0,001	100	101	102	67	-100	1,59E-06	6,33E-06
HS 578T	0,109	0,728	0,777	0,587	0,890	0,706	0,010	108	77	126	96	-91	2,23E-06	7,62E-06
MDA-MB-435	0,054	1,500	1,276	1,470	0,865	0,631	0,021	85	98	56	40	-62	3,00E-07	9,60E-06
MDA-N	0,028	2,652	2,468	2,616	2,606	1,738	0,026	93	99	98	65	-9	2,02E-06	>1,26E-05
BT-549	0,112	1,798	1,876	1,940	1,963	1,697	0,018	105	108	110	94	-84	2,22E-06	8,08E-06
T-47D	0,098	0,824	0,883	0,336	0,539	0,398	0,027	108	33	61	41	-73	,	2,90E-06

5 En el segundo conjunto de ensayos, según la Tabla 2, las curvas de respuesta frente a la dosis y el gráfico de medias como se muestra en las Figuras 3A a 3I, y en la Figura 4, el trióxido de arsénico fue eficaz reduciendo el crecimiento celular frente a todas las líneas celulares ensayadas. Los resultados fueron consistentes con los obtenidos del primer conjunto de ensayos. En particular, varias líneas celulares de melanoma parecieron ser especialmente sensibles en los diversos parámetros de respuesta principales.

10 En conclusión, estos resultados demuestran que el trióxido de arsénico es eficaz inhibiendo el crecimiento de células leucémicas y células de cáncer *in vitro*, y que el trióxido de arsénico se puede usar en seres humanos para tratar una amplia variedad de leucemias y cánceres, incluyendo cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, melanoma, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama.

REIVINDICACIONES

1. Trióxido de arsénico para uso en el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón.
- 5 2. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico se formula como una disolución iónica.
3. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración de alrededor de 10 µg a alrededor de 200 mg por día.
4. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 70 mg por día.
- 10 5. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración parenteral.
6. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración intravenosa.
- 15 7. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 6, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 150 mg por día.
8. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende adicionalmente una cantidad eficaz de al menos otro agente terapéutico adicional.
9. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 8, en el que el otro agente terapéutico es un agente quimioterápico.
- 20 10. Trióxido de arsénico para uso según la reivindicación 8, en el que el otro agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en etopósido, cisplatino, carboplatino, fosfato de estramustina, vinblastina, metotrexato, hidroxíurea, ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, taxol, dietilestilbestrol, VM-26 (vumon), BCNU, ácido todo trans retinoico, procarbazona, citocinas, vacunas terapéuticas, e inmunomoduladores.
- 25 11. Uso de trióxido de arsénico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de colon, ovárico, renal, de vejiga, de próstata y de pulmón.

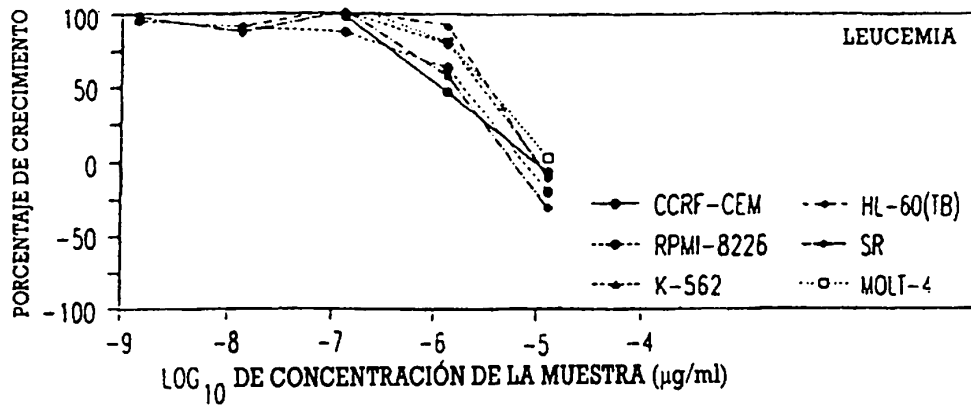


FIG.1A

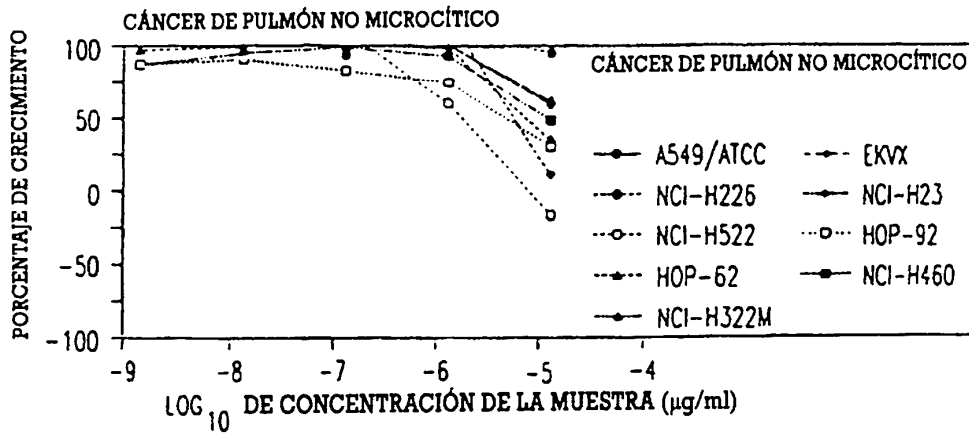


FIG.1B

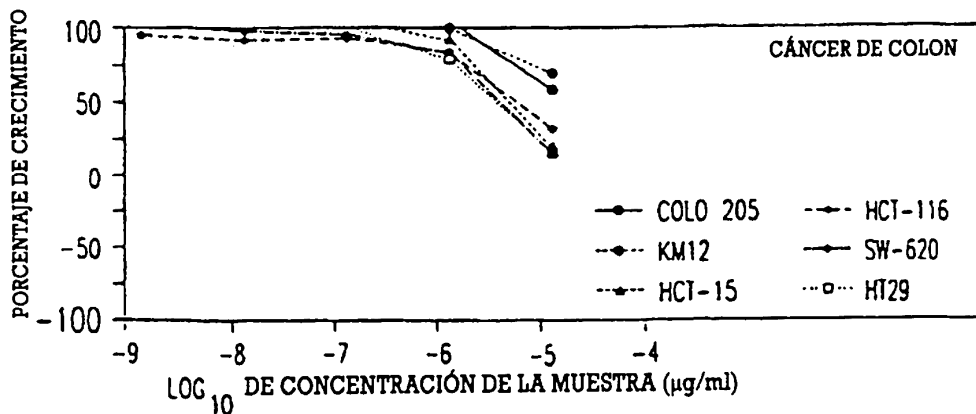


FIG.1C

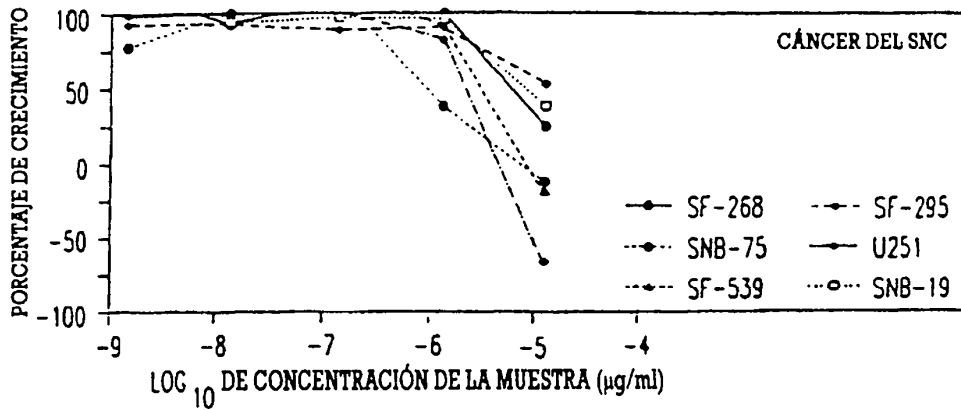


FIG. 1D

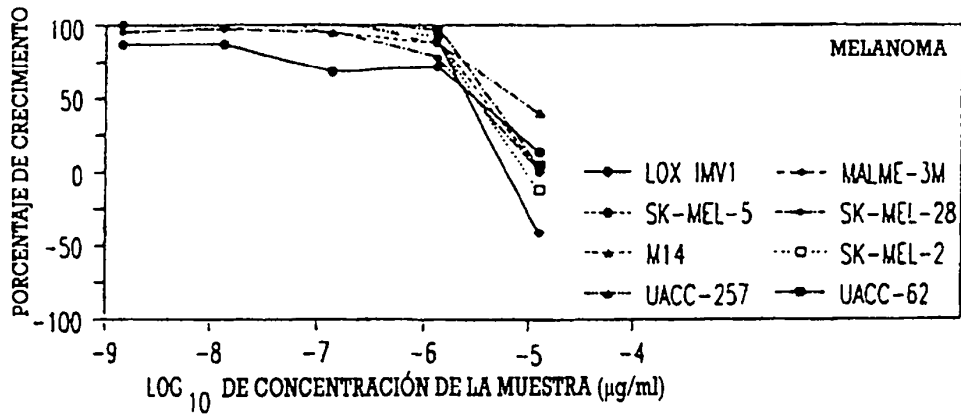


FIG. 1E

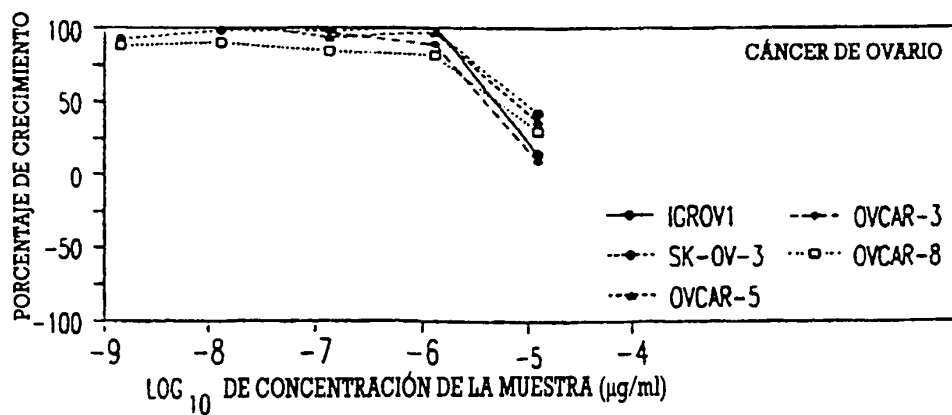


FIG. 1F

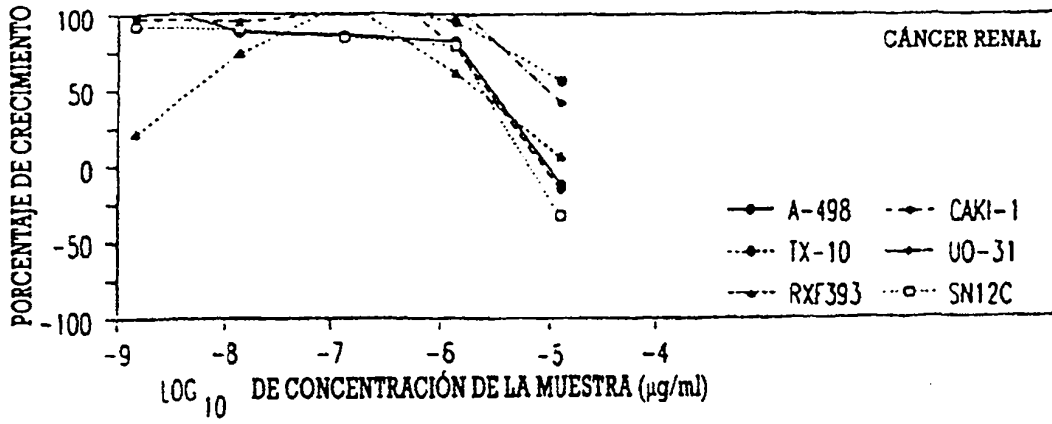


FIG. 1G

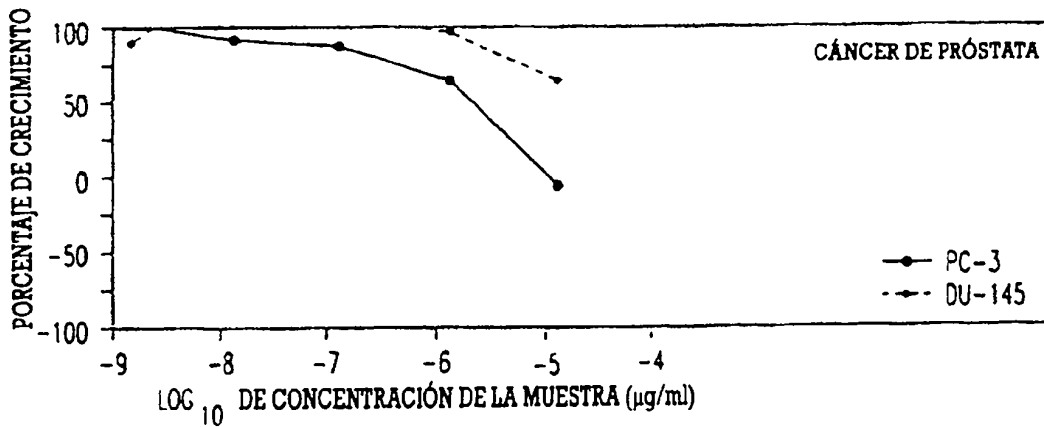


FIG. 1H

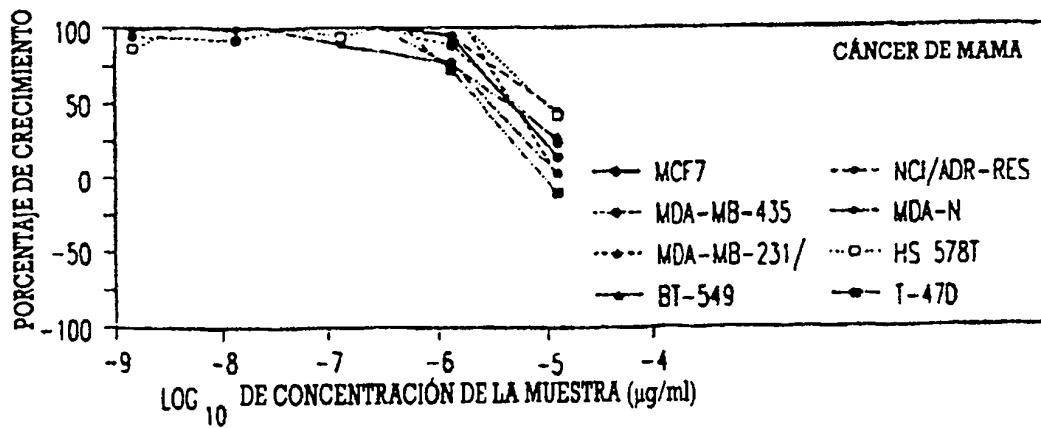
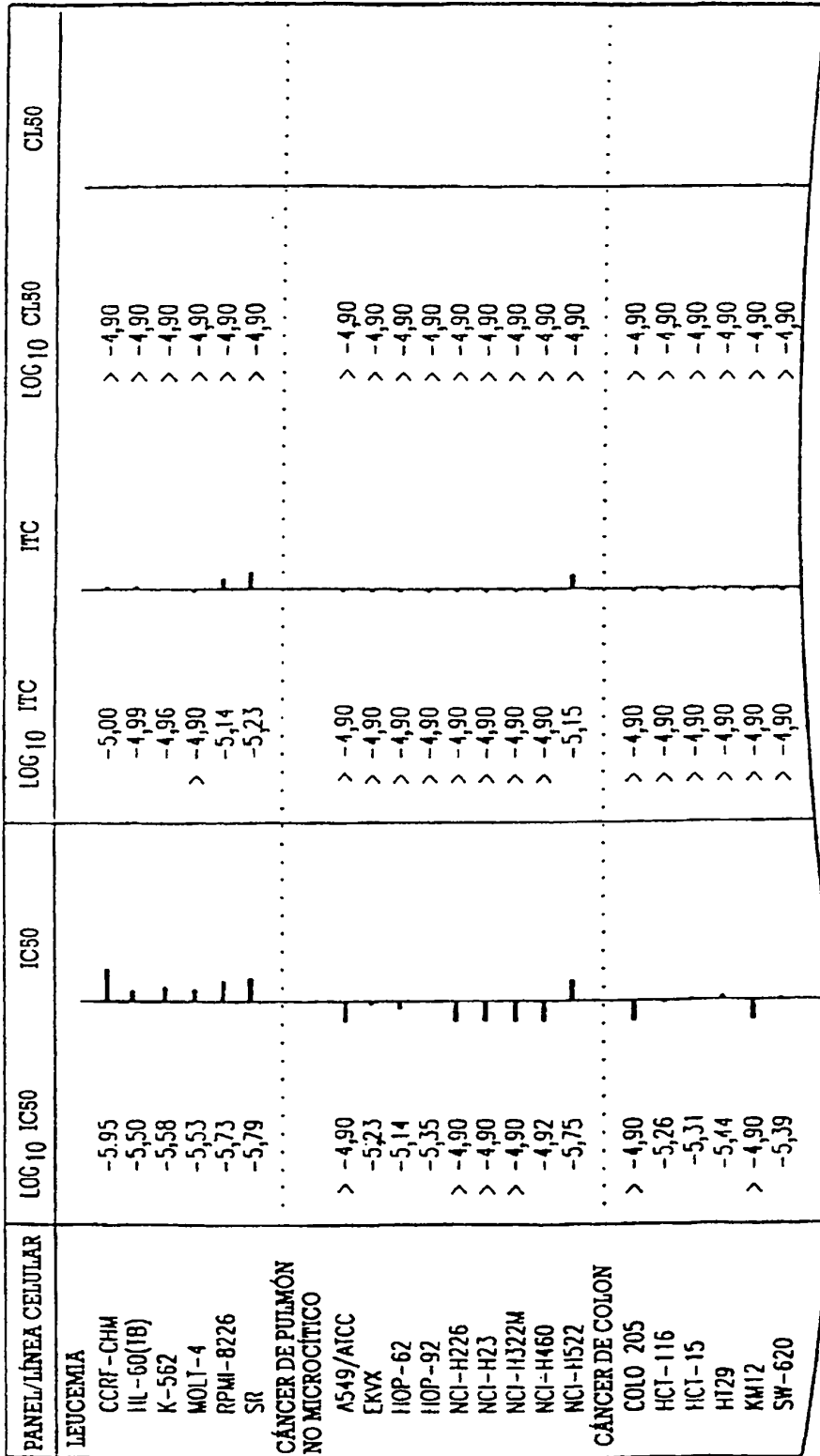


FIG. 1I

GRÁFICOS DE MEDIAS



CONTINUA EN LA FIG. 2B

FIG. 2A

CONTINUACIÓN DESDE LA FIG.2A
GRÁFICO DE MEDIAS

PANEL/LÍNEA CELULAR	LOG ₁₀ IC80	IC80	LOG ₁₀ ITC	ITC	LOG ₁₀ CL50	CL50
CÁNCER DEL SNC						
SF-268	-5,25		> -4,90		> -4,90	
SF-295	> -4,90		> -4,90		> -4,90	
SF-539	-5,51		-5,05		> -4,90	
SNB-19	-5,13		> -4,90		> -4,90	
SNB-75	-6,07		-5,16		> -4,90	
U251	-5,69		-5,36		-5,02	
MELANOMA						
LOX IMVI	-5,52		> -4,90		> -4,90	
MALME-3M	-5,60		-5,22		> -4,90	
M14	-5,46		> -4,90		> -4,90	
SK-MEL-2	-5,52		-5,06		> -4,90	
SK-MEL-28	-5,40		> -4,90		> -4,90	
SK-MEL-5	-5,54		> -4,90		> -4,90	
UACC-257	-5,11		> -4,90		> -4,90	
UACC-62	-5,39		> -4,90		> -4,90	
CÁNCER DE OVARIO						
IGROV1	-5,28		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-3	-5,39		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-5	-5,15		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-8	-5,33		> -4,90		> -4,90	
SK-OV-3	-5,07		> -4,90		> -4,90	

CONTINUA EN LA FIG. 2C

FIG. 2B

CONTINUACIÓN DESDE LA FIG. 2B
 GRAFICOS DE MEDIAS

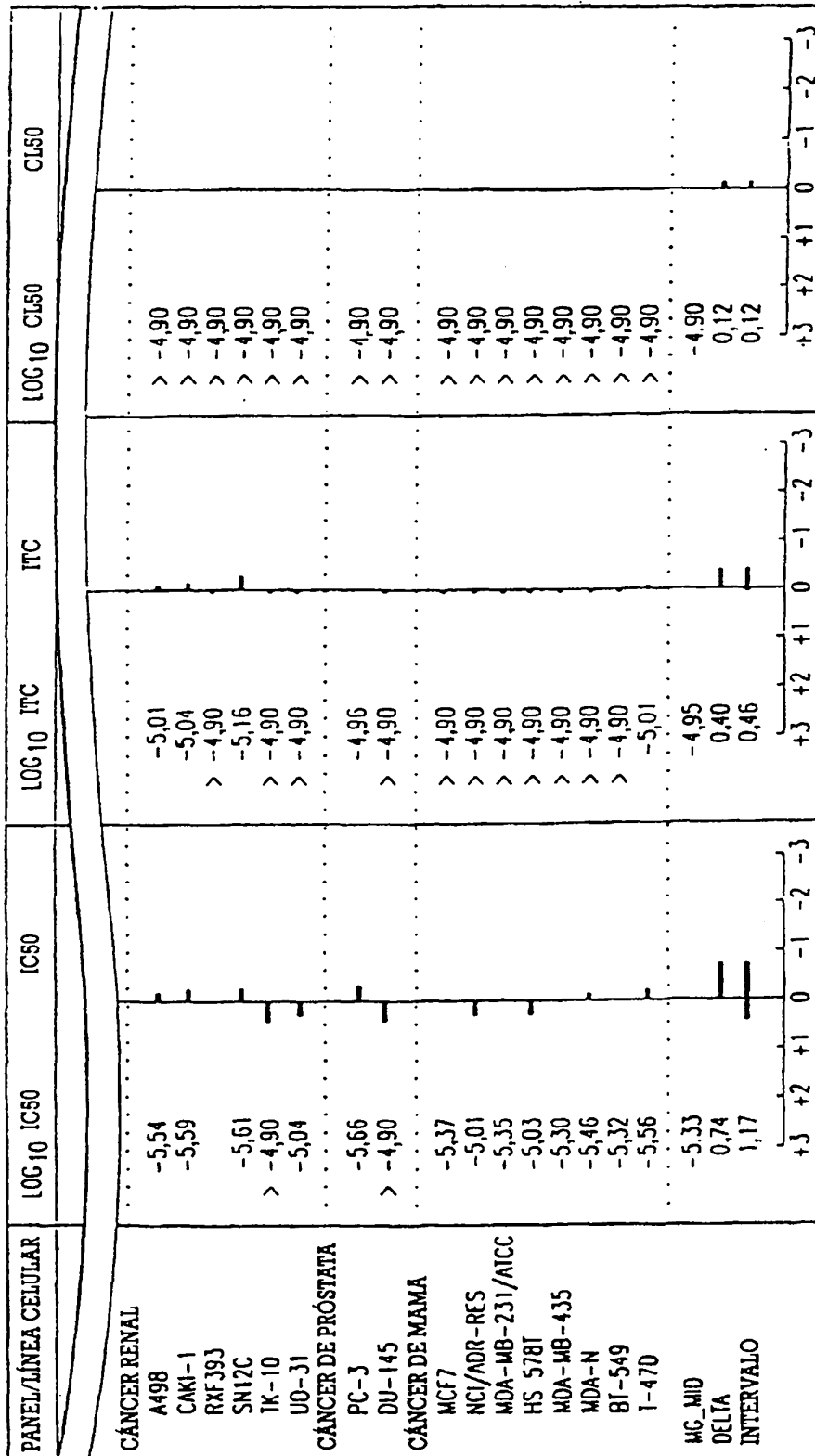


FIG. 2C

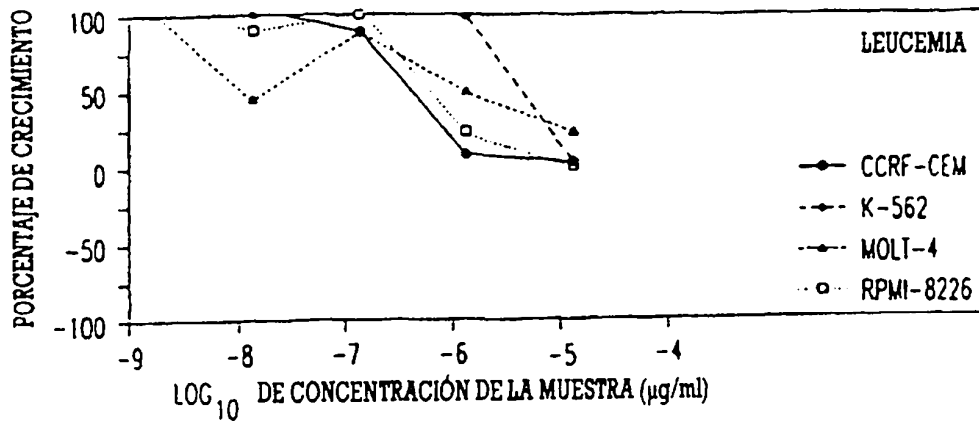


FIG.3A

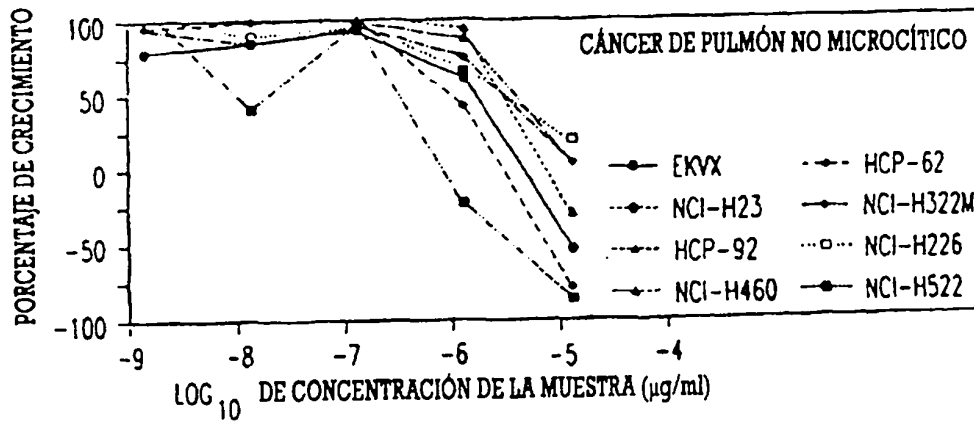


FIG.3B

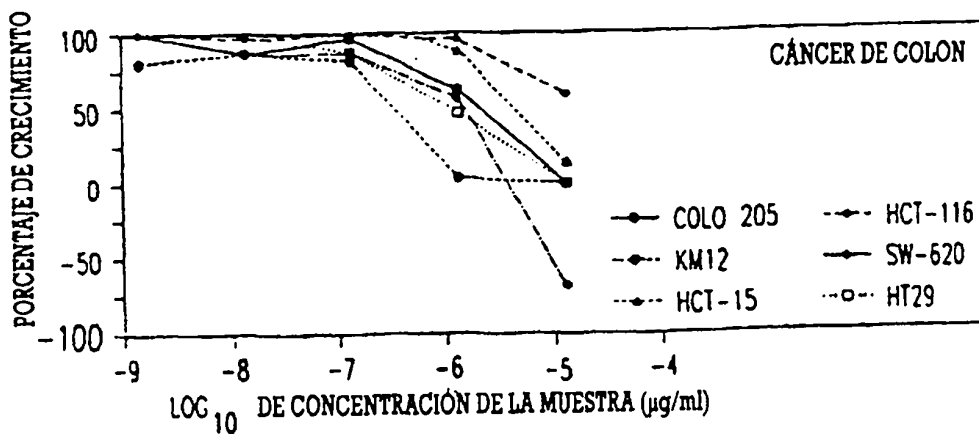


FIG.3C

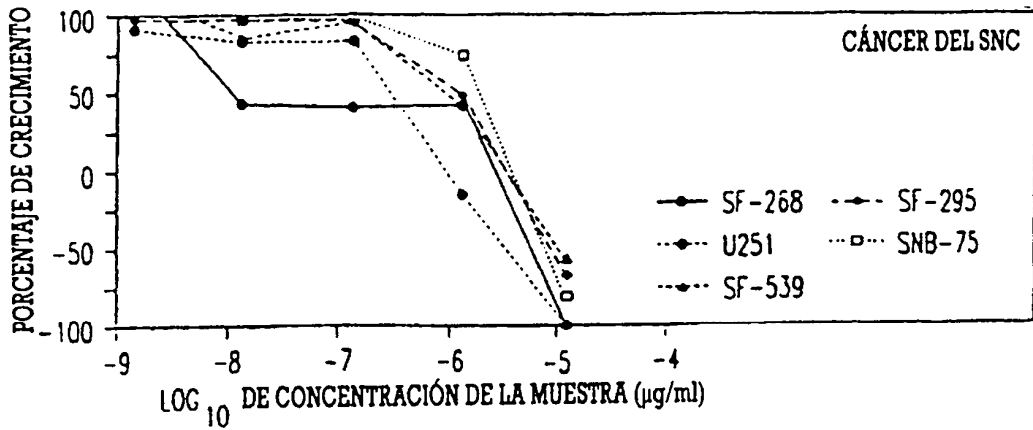


FIG.3D

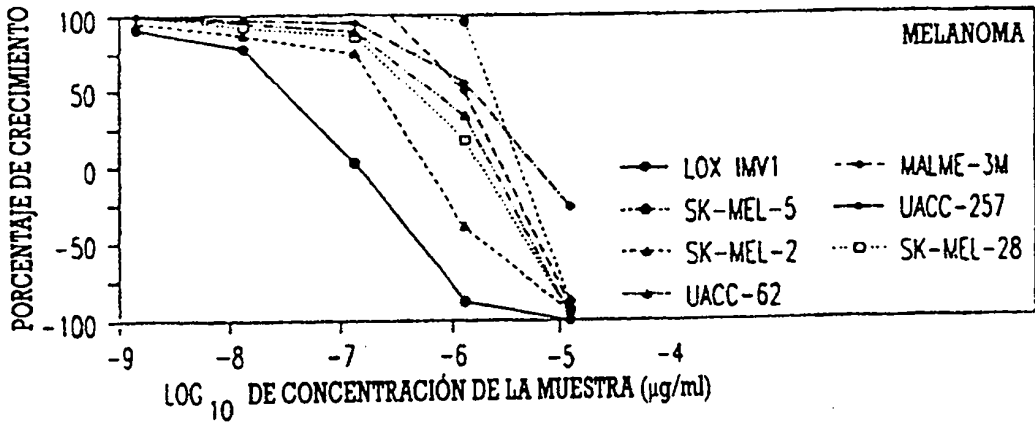


FIG.3E

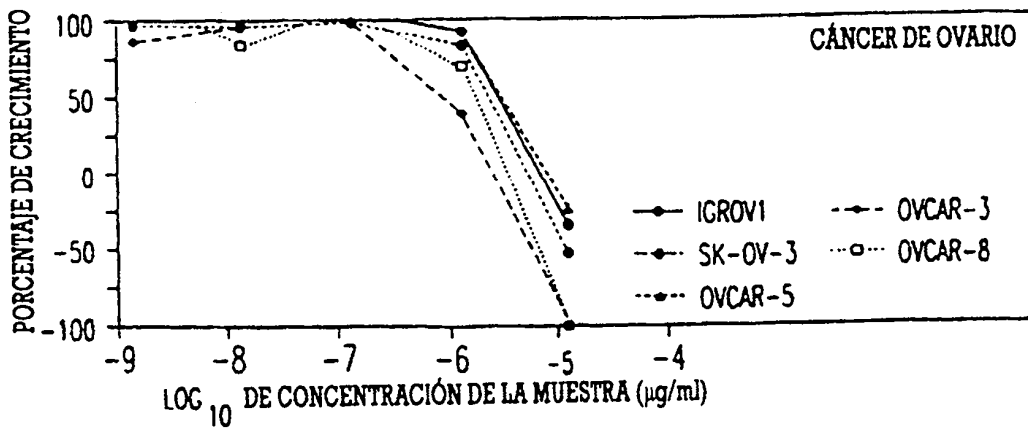


FIG.3F

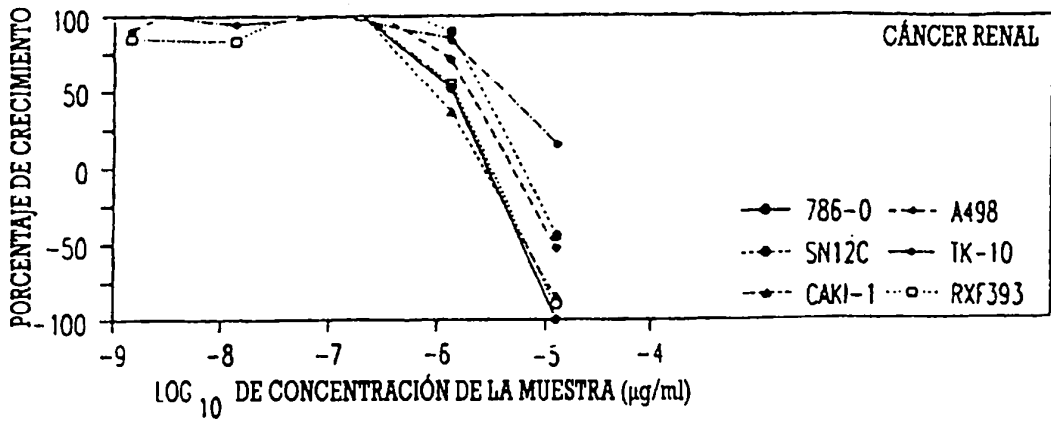


FIG. 3G

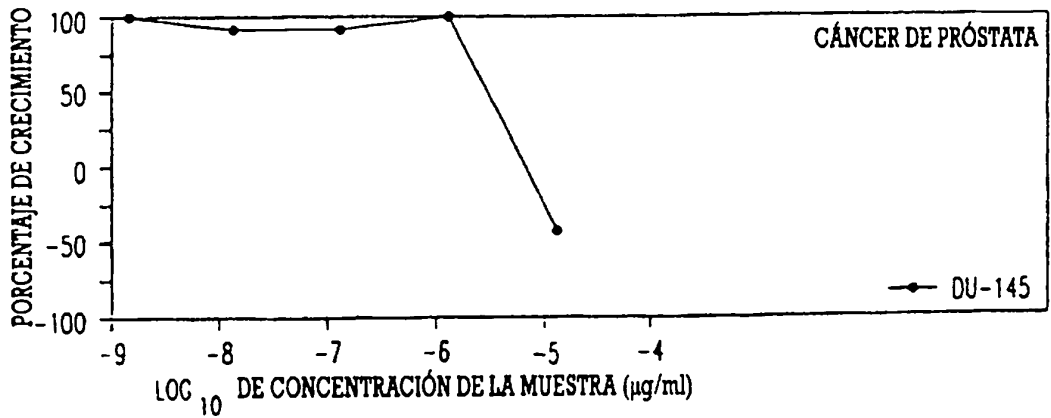


FIG. 3H

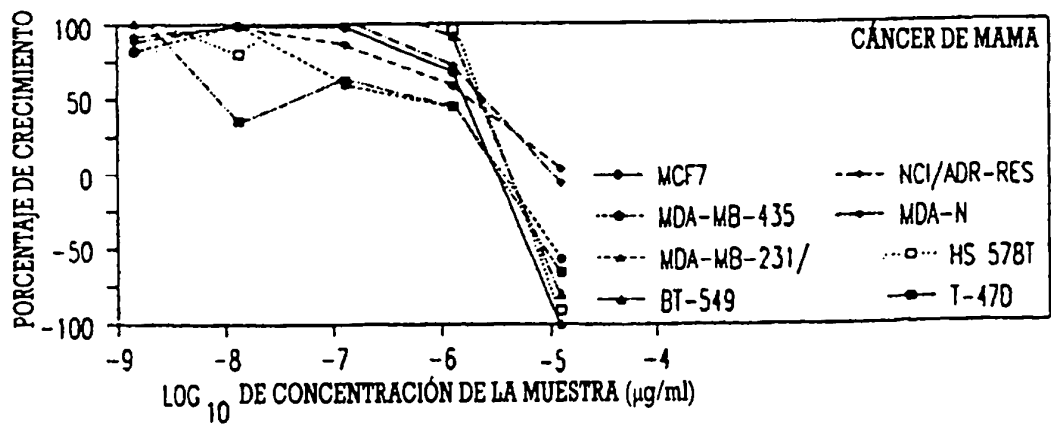
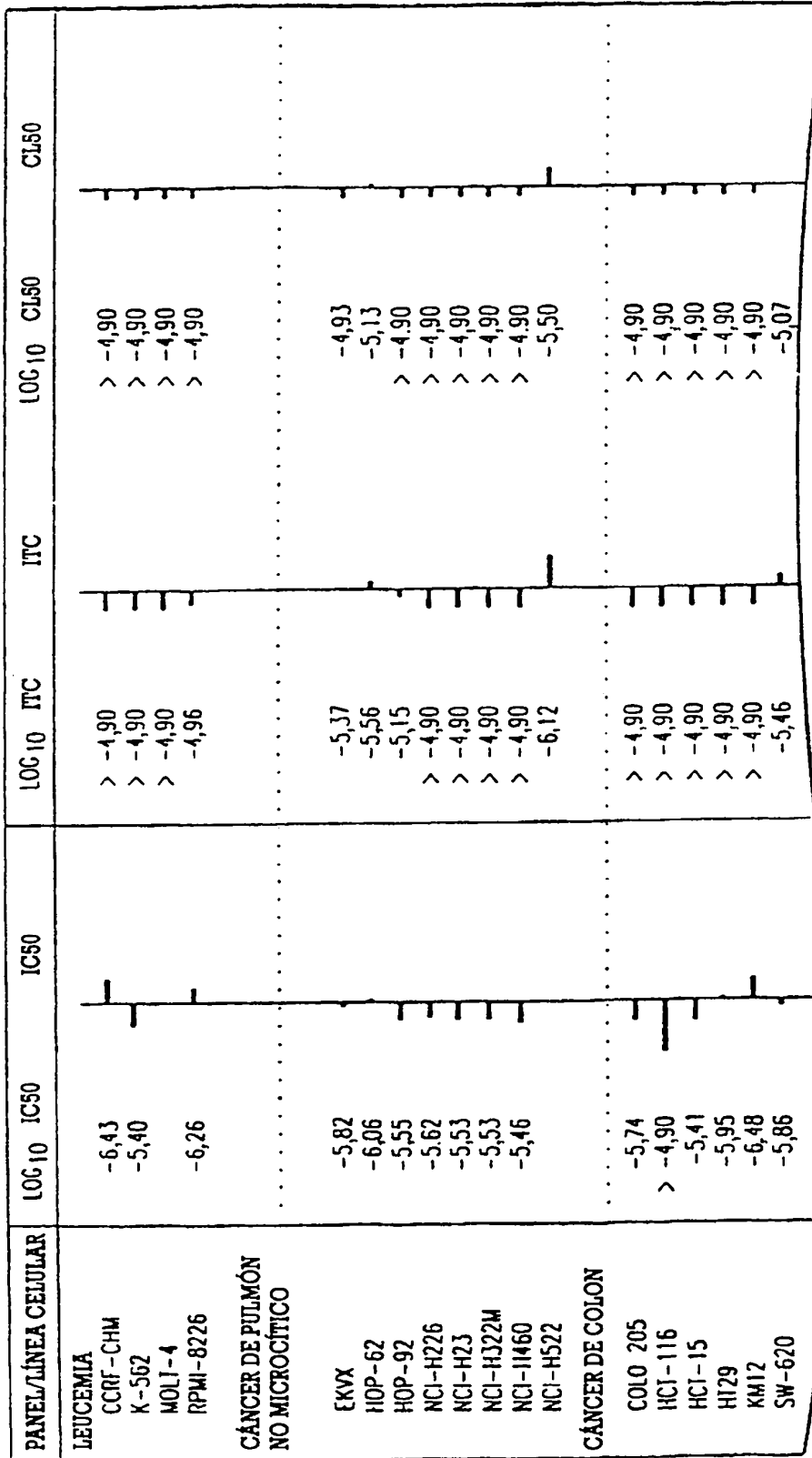


FIG. 3I

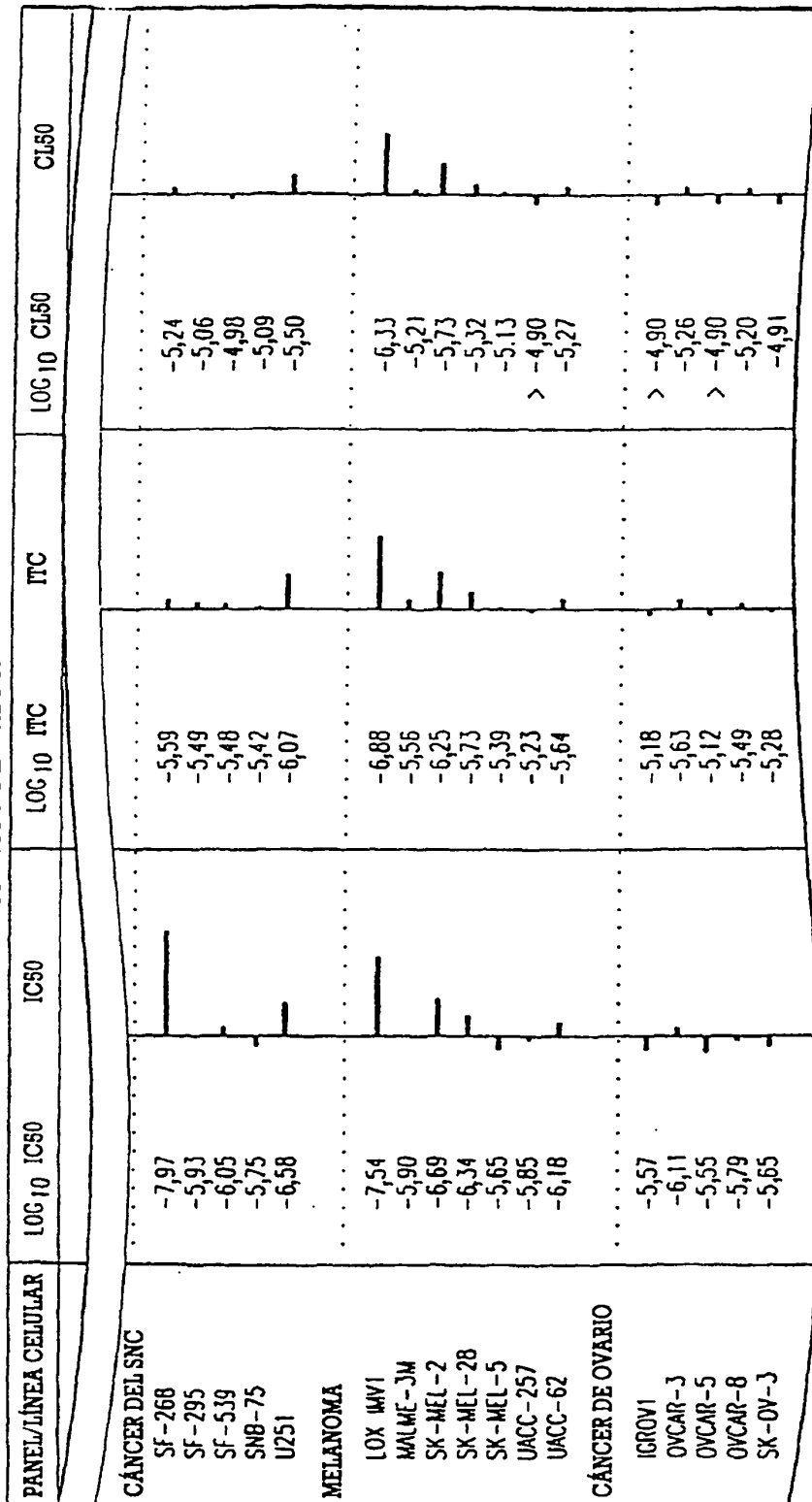
GRÁFICOS DE MEDIAS



CONTINUA EN LA FIG. 4B

FIG. 4A

CONTINUACIÓN DESDE LA FIG.4A
GRÁFICO DE MEDIAS



CONTINUA EN LA FIG. 4C

FIG.4B

CONTINUACIÓN DESDE LA FIG. 4B
 GRAFICOS DE MEDIAS

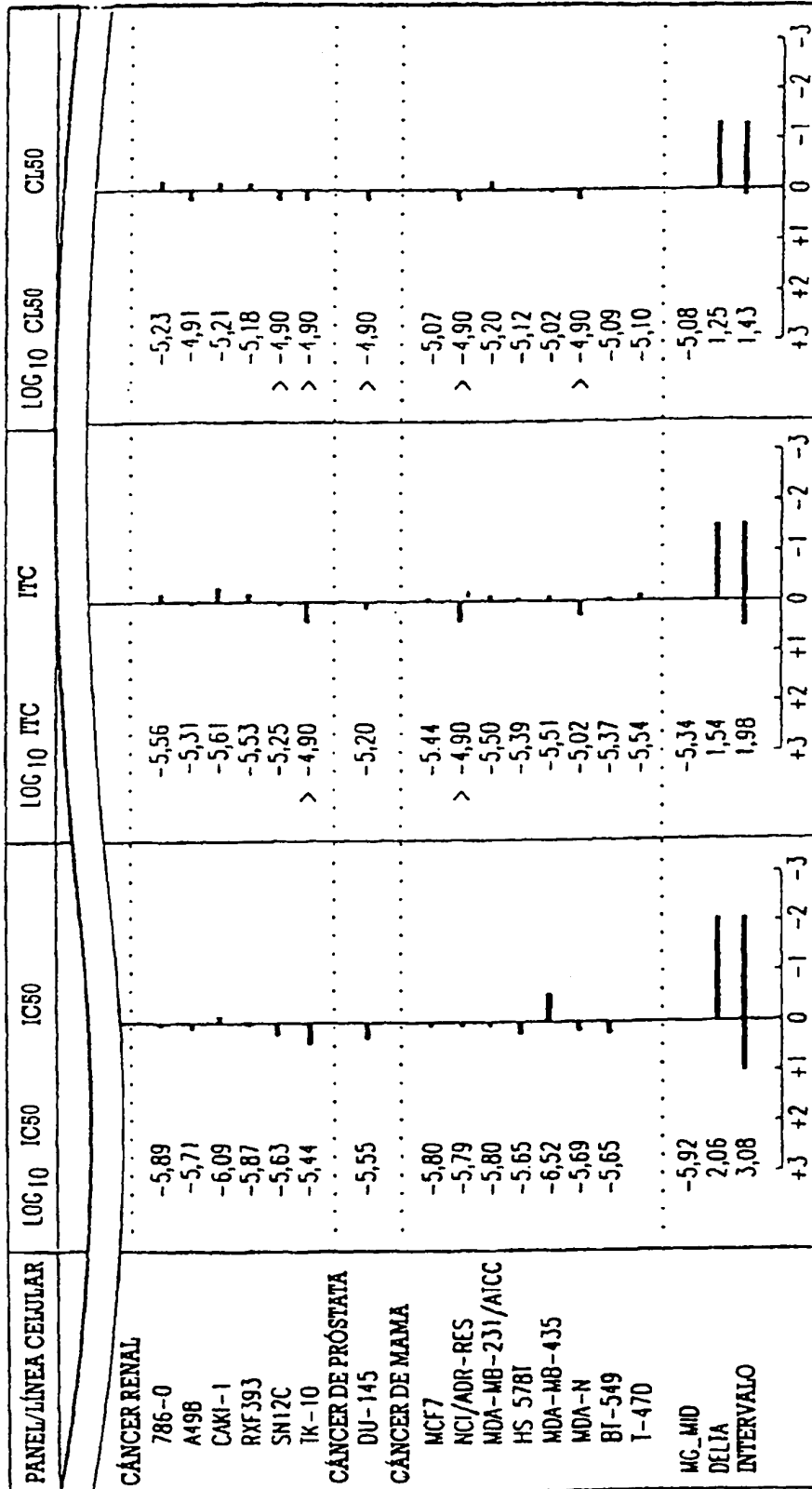


FIG.4C