



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 787**

51 Int. Cl.:  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/495** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01980710 .6**  
96 Fecha de presentación : **06.11.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1365808**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Composiciones para tratamiento antitumoral que contienen ecteinascidina 743.**

30 Prioridad: **06.11.2000 US 246233 P**  
**13.11.2000 US 248095 P**  
**19.10.2001 US 345982 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.05.2011**

73 Titular/es: **PHARMA MAR, S.A.**  
**c/ De la Calera, 3**  
**Polígono Industrial de Tres Cantos**  
**28760 Tres Cantos, Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Takahashi, Naoto;**  
**Weitman, Steve;**  
**D'Incalci, Maurizio;**  
**Faicloth, Glynn, Thomas;**  
**Giavazzi, Raffaella y**  
**Gescher, Andreas**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 787 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 para tratamiento antitumoral que contienen ecteinascidina 743

La presente invención se refiere a tratamientos antitumorales eficaces.

La ecteinascidina 743, ET-743, es un agente anticancerígeno procedente de una fuente marina.

5 **FUNDAMENTO DE LA INVENCION**

El lector es remitido al documento WO0069441 publicado el 23 de noviembre de 2000 para información sobre las composiciones y usos de ET-743 para tratar el cáncer que se considera conforme al Art.54(3)EPC

**SUMARIO DE LA INVENCION**

10 De acuerdo con un aspecto de esta invención, sus autores proporcionan terapias de combinación eficaces basadas en la ecteinascidina 743, utilizando otros fármacos.

El objeto de la invención se define en las reivindicaciones.

**REALIZACIONES PREFERIDAS**

15 Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o ser proporcionados como una composición separada para administración en el mismo momento o en un momento diferente. La identidad del otro fármaco no está limitada particularmente y candidatos adecuados incluyen:

a) fármacos con efectos antimitóticos, especialmente aquellos cuyos elementos citoesqueléticos diana, incluyendo moduladores de los microtúbulos, tales como fármacos del grupo de los taxanos (tales como taxol, paclitaxel, taxotero, docetaxel), podofilotoxinas o alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina);

20 b) fármacos antimetabólicos, tales como 5-fluorouracil-citarabina, gemcitabina, análogos de la purina, tales como pentostatina, metotrexato);

c) agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (tal como ciclofosfamida o ifosfamida);

d) fármacos que tienen como diana DNA, tales como los fármacos antraciclínicos, adriamicina, doxorubicina, farmorubicina o epirubicina;

e) fármacos que tienen como dianas topoisomerasas, tal como etopósido;

25 f) hormonas y agonistas o antagonistas de hormonas, tales como estrógenos, antiestrógenos (tamoxifeno y compuestos relacionados) y andrógenos, flutamida, leuprorelina, goserelina, ciprotrona o octreotida;

g) fármacos que tienen como diana la transducción de señales en células tumorales incluyendo derivados de anticuerpos, tal como herceptina;

30 h) fármacos alquilantes, tales como fármacos de platino (cis-platino, carboplatino, oxaliplatino, paraplatino) o nitrosoureas;

i) fármacos que potencialmente afectan a la metástasis de tumores, tales como inhibidores de la metaloproteinasas de matriz;

j) genoterapia y agentes antisentido;

k) agentes terapéuticos constituidos por anticuerpos;

35 l) otros compuestos bioactivos de origen marino, principalmente las didemninas, tal como aplidina;

m) análogos de esteroides, en particular dexametasona;

n) fármacos anti-inflamatorios, en particular dexametasona; y

o) fármacos anti-eméticos, en particular dexametasona.

40 Como parte de esta memoria descriptiva de patente, los autores incluyen una serie de ejemplos a los que se hace referencia a continuación. Estos ejemplos demuestran la mayor eficacia de ET-743 cuando se utiliza en combinación con otros fármacos y se refieren a diferentes combinaciones que utilizan ET-743.

El ejemplo 1 se refiere a combinaciones eficaces de ET-743 y doxorubicina para inhibiciones del crecimiento de tumores y usados contra sarcomas humanos y de múridos en ratones atómicos.

El ejemplo 2 muestra que ecteinascidina 743 (ET-743) y doxorubicina producen efectos citotóxicos sinérgicos en las líneas de sarcomas de tejidos blandos HT-1080 y HS-18.

5 Estos dos ejemplos muestran efectos más que aditivos de la combinación de ET-743 con antraciclina (en particular doxorubicina) que es más eficaz que sola contra tumores humanos (en estos experimentos específicos, sarcoma), cuyos efectos aparecen independientemente de la secuencia de administración. Dichos resultados son una buena perspectiva para el tratamiento de pacientes.

El ejemplo 3 muestra un efecto citotóxico sinérgico de ET-743 y cisplatino.

10 El ejemplo 4 proporciona una evaluación secuencial de ET-743 en combinaciones con agentes quimioterapéuticos contra un panel de líneas de células tumorales humanas, en particular combinaciones de ET-743 con doxorubicina, taxol, SN-38, cisplatino y gemcitabina.

15 Estos dos ejemplos muestran efectos más que aditivos de la combinación de ET-743 con compuestos antitumorales de platino, (en particular cis-platino) con el análogo de nucleósidos gemcitabina y con un inhibidor de topoisomerasa II (SN38, que es el agente activo producido a partir del pro-fármaco CPT-11, un fármaco del grupo de la camptotecina). De nuevo estas combinaciones son más eficaces que el fármaco solo frente a tumores humanos (en estos experimentos específicos contra una variedad de células tumorales: sarcoma de ovario, colon, pulmón, mama y huesos), cuyos efectos dependían en algunos casos de la secuencia de exposición. De nuevo existen buenas perspectivas para el tratamiento de pacientes.

Curiosamente, la acción sinérgica no era claramente predecible: el ejemplo 4 indica que en la mayoría de las combinaciones analizadas, no se observó sinergia (de hecho, en algunos casos se registró cierto antagonismo).

20 El ejemplo 5 se refiere a la evaluación de combinaciones de ET-743 con doxorubicina o trimetrexato o paclitaxel.

Dicho ejemplo muestra efectos más que aditivos de la combinación de ET-743 con antraciclina (en particular doxorubicina) que es más eficaz que sola contra tumores humanos (en estos experimentos específicos, sarcoma), cuyos efectos aparecen independientemente de la secuencia de administración. Dichos resultados muestran una buena promesa para el tratamiento de pacientes.

25 Los ejemplos 6 a 8 refuerzan y complementan los ejemplos anteriores y especialmente muestran la sinergia de ET-743 y doxorubicina y también ET-743 con cisplatino.

El ejemplo 9 demuestra una clase diferente de eficacia de las combinaciones de esta invención, en el que dosis elevadas de dexametasona protege frente a la hepatotoxicidad de ecteinascidina-743 (ET-743).

30 En resumen, esta invención proporciona por consiguiente composiciones para utilizar en tratamientos, procesos para preparar dichas composiciones y realizaciones afines.

La presente invención se extiende también a los compuestos de la invención para uso en un método de tratamiento y al uso de los compuestos en la preparación de una composición para tratamiento de cáncer.

35 Por tanto, la presente invención se puede utilizar para tratar cualquier mamífero, principalmente un ser humano, afectado de cáncer, que comprende administrar al individuo afectado una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una de sus composiciones farmacéuticas.

La presente invención se refiere también a preparaciones farmacéuticas que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable, que contiene como principio activo un compuesto o compuestos de la invención, así como a los procedimientos para su preparación.

40 Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier sólido (comprimidos, píldoras, cápsulas, granulados, etc.) o líquido (soluciones, suspensiones o emulsiones) con composición adecuada y para administración oral, tópica o parenteral y pueden contener el compuesto puro o en combinación con cualquier vehículo u otros compuestos farmacológicamente activos. Puede ser necesario que estas composiciones sean estériles cuando se administran parenteralmente.

45 La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede realizarse por cualquier método adecuado, tal como por perfusión intravenosa, preparaciones para administración por vía oral, intraperitoneal e intravenosa. Los autores de la presente invención prefieren que se utilicen tiempos de perfusión de hasta 24 horas, más preferiblemente 2-12 horas, e incluso más preferiblemente 2-6 horas. Especialmente deseables son tiempos de perfusión cortos que permitan que se realice el tratamiento sin estancia hospitalaria. Sin embargo, si se requiere la perfusión puede ser de 12 a 24 horas o incluso más larga. La perfusión se puede realizar a intervalos adecuados de por ejemplo 2 a 4 semanas. Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención se pueden suministrar por encapsulación en liposomas o nanoesferas, en formulaciones de liberación prolongada o por medios de administración estándares.

50

La dosificación correcta de los compuestos variará de acuerdo con la formulación particular, el modo de aplicación y el sitio, hospedante y tumor particulares que han de tratarse. Deben tenerse en cuenta otros factores como la edad, peso, sexo, tiempo de administración, tasa de excreción, estado del hospedante, combinaciones de fármacos, sensibilidades a la reacción y gravedad de la enfermedad. La administración se puede realizar continua o periódicamente con la dosis máxima tolerada.

Las combinaciones de esta invención se pueden utilizar en pacientes que no responden al tratamiento. El lector es remitido al documento WO0069441 para información sobre los esquemas de dosificación para ET-743 y otra información de uso de la terapia de combinación de esta invención.

## EJEMPLOS DE LA INVENCION

### Ejemplo 1

Combinaciones eficaces de ET-743 y doxorubicina para inhibiciones del crecimiento de tumores contra los sarcomas humanos y de múridos en ratones atímicos.

La ET-743 tiene una actividad clínica confirmada en pacientes con sarcoma de partes blandas y osteosarcoma que no responden a la quimioterapia previa incluyendo la doxorubicina (Dx) y la isosfamida. En vista del valor clínico potencial al combinar ET-743 con Dx los autores de la presente invención han investigado esta combinación contra el fibrosarcoma de múridos UV2237, su sublínea resistente a mdr UV2237/ADR y el xenoinjerto de rdbdomiosarcoma humano TE671. Tanto ET-743 como Dx solas eran eficaces contra el fibrosarcoma UV2237 de múridos, mientras que cada una era inactiva o marginalmente activa tanto contra UV2237/ADR como contra TE671. Sin embargo la combinación de ET-743 y Dx era eficaz en los 3 modelos. La sinergia era particularmente notable en el rdbdomiosarcoma TE671 humano y parecía independiente de la secuencia o combinación de fármacos.

Después de tratamientos i.v. de cada fármaco realizados cuando el tumor TE671 pesaba aproximadamente 100 mg, la inhibición del peso de tumor (abreviadamente en lo sucesivo TWI por la expresión inglesa *Tumor Weight Inhibition*) y los valores logarítmicos de mortandad celular (abreviadamente LCK por la expresión inglesa *Log Cell Kill*) eran respectivamente 46% y 0,132 para ET-743 (0,1 mg/kg) sola, 50% y 0,33 para Dx (10 mg/kg) sola, 77% y 0,924 para ET-743 (0,1 mg/kg) y Dx (10 mg/kg) administradas simultáneamente, 82% y 1,12 para la combinación de ET-743 (0,1 mg/kg) administrada 1 hora antes que Dx (10 mg/kg) y 75% y 0,85 para la combinación de ET-743 (0,1 mg/kg) administrada 1 h después de Dx (10 mg/kg).

Estos datos sugieren que la combinación de ET-743 y Dx puede también ser eficaz en tumores que no son sensibles o marginalmente sensibles a estos fármacos administrados solos, proporcionando así una fuerte base para investigaciones clínicas que utilicen esta combinación.

### Ejemplo 2

La ecteinascidina 743 (ET-743) y la doxorubicina producen efectos citotóxicos sinérgicos en las líneas de sarcomas de tejidos blandos HT-1080 y HS-18.

Se evaluaron dos líneas celulares de sarcoma, HT 1080, una línea celular de fibrosarcoma sensible a ET-743 [Concentración inhibidora del 50% (en lo sucesivo abreviadamente,  $CI_{50}$ ) = 10 pm] y HS-18, una línea celular de liposarcoma menos sensible a ET-743 ( $CI_{50}$  = 270 pm) para determinar la toxicidad a ET-743 en combinación con cada uno de doxorubicina, trimetrexato o paclitaxel. Cuando se utilizó ET-743 en combinación con cada uno de estos fármacos a una relación molar constante y se analizó por el método de Chou y Talalay, se obtuvieron efectos sinérgicos (incubación durante 72 h) con la combinación ET-743-doxorubicina, pero no con la combinación de ET-743 con trimetrexato o paclitaxel. Cuando las células se expusieron a ET-743 durante 72 h y cada uno de doxorubicina, trimetrexato o taxol durante las últimas 48 horas de incubación, también se obtuvieron efectos sinérgicos con doxorubicina contra ambas líneas celulares de sarcoma. Es interesante advertir que la secuencia paclitaxel seguido de ET-743 era más eficaz que la secuencia opuesta. Estos resultados animan a realizar ensayos clínicos de doxorubicina en combinación con ET-743 para tratar pacientes con sarcoma de tejidos blandos, puesto que ambos de estos fármacos han mostrado actividad contra esta enfermedad.

### Ejemplo 3

#### Efecto citotóxico sinérgico de ET-743 y cisplatino

La ecteinascidina 743 (ET-743) ha mostrado una sorprendente actividad antitumoral en diversos sistemas preclínicos y una prometedora actividad clínica. La ET-743 se une a guaninas N2 en la ranura menor y afecta a la regulación de la transcripción (Minuzzo et al., PNAS, Vol. 97,6780-84, 2000).

Estudios previos han indicado que células deficientes en reparación de errores de apareamiento (abreviadamente MMR por la expresión inglesa *MisMatch Repair*) son igualmente sensibles a ET-743 como células competentes. Las células deficientes en reparación de escisión de nucleótidos (abreviadamente NER por la expresión inglesa *Nucleotide Excision Repair*) muy sensibles al cisplatino son 6-8 veces menos sensibles a ET-743. Basándose en los diferentes mecanismos

implicados en la reparación de ET-743 y cisplatino y debido al interés clínico potencial de esta combinación, los autores de la presente invención han realizado estudios para evaluar los efectos citotóxicos de ET-743 y cisplatino en diversas líneas de células tumorales humanas. En este estudio se utilizaron una línea de células Igrov-1 de cáncer de ovario humano, una sublínea resistente a ET-743 (IG/PSC/ET) y líneas de células de cáncer de colon humano HCT 116 (deficientes en MMR) y HCT11-ch3 (competente en MMR).

Las células se trataron durante 1 o 24 horas con concentraciones diferentes de ET-743 o cisDDP, solos o in combinaciones, y se evaluó la citotoxicidad utilizando un análisis colorimétrico después de tinción con sulforodamina B. En todas las líneas celulares se observó un efecto sinérgico tanto en la exposición de 1 h como de 24 h. Hay que resaltar que en HCT116 resistente a cisDDP, la ET-743 era evidentemente capaz de invertir la sensibilidad incluso a concentraciones de ET-743 que sola eran marginalmente eficaces. Considerados en conjunto, los datos proporcionan una base para emprender estudios clínicos que combinen ET-743 con cisDDP.

#### Ejemplo 4

Combinaciones de ET-743 con doxorubicina, taxol, Sn-38, cisplatino y gemcitabina

Se evaluó ET-743 en combinación con doxorubicina, taxol, SN-38, cisplatino y gemcitabina contra un panel de líneas de células tumorales humanas. Estos estudios se diseñaron para determinar el tipo de interacción fármaco-fármaco entre ET-743 y agentes quimioterapéuticos estándares y la influencia de la secuencia de exposición sobre la actividad antitumoral. Se utilizaron combinaciones múltiples de ET-743 con agentes citotóxicos estándares con un diseño sin modelo (Laska, et al. Biometrics 50:834, 1994) para describir el tipo de interacción fármaco-fármaco. Estos estudios sugieren que independientemente de la exposición, el más observado típicamente es un modelo aditivo de interacción fármaco-fármaco.

Se observó una interacción sinérgica fármaco-fármaco cuando se combinó ET-743 contra líneas de células tumorales de carcinoma de pulmón no microcítico (pre-exposición a SN-38), de osteosarcoma (pre-exposición a ET-743 seguida de cisplatino), de mama (pre-exposición a ET-743 seguida de gemcitabina) y de colon (pre-exposición a ET-743 seguida de SN-38 y exposición simultánea a SN-38). Se observó un modelo aditivo/sinérgico (pre-exposición a ET-743 seguida de SN-38 contra NSCL; pre-exposición a SN-38 contra colon y NSCL; exposición simultánea a cisplatino contra osteosarcoma y con SN-38 contra líneas NSCL) de interacción fármaco-fármaco. Se observó una prueba de antagonismo cuando se utilizó taxol simultáneamente contra dos líneas NSCL y doxorubicina contra una línea celular de rhabdomyosarcoma.

Estos estudios sugieren que ET-743 que está en la Fase II de ensayos clínicos, podría combinarse con diversos agentes citotóxicos contra una amplia gama de tipos de tumores.

#### Material y métodos

##### Cultivo celular:

Se hicieron crecer, en RPMI-1640 complementado con suero de bovino fetal al 10% y L-glutamina 2mM, líneas de células tumorales humanas de mama (MDA-435, MDA-231, T-470), de carcinoma de pulmón no microcítico (NCI-H522, NC1-H226, NCI-H23), de colon (HCT-116, HT-29, Colo-320), de osteosarcoma (HOS, U-2, OS, SaOS-2), de rhabdomyosarcoma (RH1, RH30, RD). Todos los cultivos madre se mantuvieron en matraces de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C en incubadoras humidificadas con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>-95% de aire.

##### Análisis de la CI<sub>50</sub>:

Un número predeterminado de células tumorales de crecimiento exponencial se inocularon en placas de 96 pocillos para cultivo tisular y se dejaron que se estabilizaran durante 24 horas. A continuación, se añadió a las células una placa del fármaco que consistía en concentraciones diluidas en serie de ET-743 o de agentes quimioterapéuticos estándares. Se incubaron las células como una exposición de 24 horas durante tres días seguido por la adición de MTT durante 4 horas. A continuación se solubilizaron los cristales de formazán resultantes con ácido/alcohol, determinando la absorbancia (570 nm-ensayo/630 nm-referencia) utilizando un lector de microplacas. Los resultados se expresaron como porcentaje de mortandad de las células tumorales en comparación con los controles.

##### Estudios de combinaciones:

Para los estudios de combinaciones, se muestra a continuación el esquema de concentraciones (expresadas como porcentaje de la CI<sub>50</sub> del agente individual) utilizado para caracterizar el tipo de interacción:

Concentración del fármaco (expresada como porcentaje de la CI <sub>50</sub> )	
<u>ET-743</u>	<u>Agentes estándares</u>
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

Análisis estadísticos de los estudios de combinaciones:

5 Se realizan comparaciones estadísticas con cada combinación de ensayo (75:25-ET-743/agentes estándares) y los puntos finales (100:0-ET-743 y 0:100-agentes estándares). Una observación estadísticamente significativa requiere que exista una diferencia entre el valor de la absorbancia de las combinaciones (ET-743 y agentes estándares) y los valores de ambos puntos finales (ET-743 y agentes estándares solos). Si la mayoría de ( $\geq 3$  de 5) los valores están estadísticamente por encima o por debajo de la línea, se describe entonces el antagonismo o la sinergia, respectivamente. De lo contrario el modelo es más consistente con una interacción aditiva. La interpretación es muy difícil si existe una pendiente considerable de la línea que conecta los puntos finales. Si las pendientes de las curvas de la CI<sub>50</sub> para los agentes individuales son idénticas (poco probable) entonces se puede, a veces, determinar el tipo de interacción.

Combinación secuencial de ET-743 con agentes quimioterapéuticos		
<u>Tipo de tumor/Línea celular</u>	<u>Condiciones de exposición/Agentes</u>	<u>Interacciones fármaco-fármaco observadas</u>
<u>Osteosarcoma</u>		
NOS	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a cisplatino	Sinérgica
	Exposición 24 horas a cisplatino seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
U2-OS	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a cisplatino	Aditiva
	Exposición 24 horas a cisplatino seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
Sa06	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a cisplatino	Aditiva
	Exposición 24 horas a cisplatino seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
<u>De pulmón no microcítico</u>		
	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a taxol	Aditiva
NCB-H226	Exposición 24 horas a taxol seguida de exposición 24 horas a ET-734	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/taxol	Antagónica
	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN38	Aditiva/ Sinérgica
	Exposición 24 horas a SN-38 seguida de exposición 24	

ES 2 358 787 T3

NCB-N522	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a taxol	Aditiva
	Exposición 24 horas a taxol seguida de exposición 24 horas a ET-734	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/taxol	
NCB-N23	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a taxol	Aditiva/Antagónica
	Exposición 24 horas a taxol seguida de exposición 24 horas a ET-734	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/taxol	
De mama	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN38	Antagónica Aditivas/ Sinérgica
	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a taxol	Aditiva/Antagónica
	Exposición 24 horas a taxol seguida de exposición 24 horas a ET-734	Aditiva
MDA-435	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a gemcitabina	Aditiva
	Exposición 24 horas a gemcitabina seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/gemcitabina	
MDA-231	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a gemcitabina	Aditiva
	Exposición 24 horas a gemcitabina seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-473/gemcitabina	Aditiva
T47-8	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a gemcitabina	Aditiva
	Exposición 24 horas a gemcitabina seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
<u>De colon</u>		
HCT-116	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN-38	Sinérgicas
	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN-38	Aditiva
NT-29	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN-38	Aditiva
	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN-38	Aditiva
Colo-320	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN-38	Aditiva
	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a SN-38	Aditiva/Sinérgica
Rabdomiosarcoma		

RN1	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a doxorubicina	Aditiva
	Exposición 24 horas a doxorubicina seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/doxorubicina	Aditiva
RD	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a doxorubicina	Aditiva
	Exposición 24 horas a doxorubicina seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/doxorubicina	Aditiva
RN30	Exposición 24 horas a ET-743 seguida de exposición 24 horas a doxorubicina	Aditiva
	Exposición 24 horas a doxorubicina seguida de exposición 24 horas a ET-743	Aditiva
	Exposición simultánea 24 horas a ET-743/doxorubicina	Aditiva

Conclusiones-Sumario

Estos estudios sugieren que independientemente de la secuencia de exposición entre ET-743 y los agentes quimioterapéuticos estándares, se observa típicamente un modelo aditivo de interacción fármaco-fármaco.

5 Se observaron pruebas de sinergia cuando las líneas NC1-H522 y NC1-H23 NSCL se expusieron previamente a SN-38, previa exposición a ET-743 con cisplatino contra osteosarcoma HOS, la línea de células de mama T-470 con gemcitabina, SN-38 contra HCT-116 de colon y exposición simultánea con SN-38 contra la línea celular de tumor de colon Colo-320.

Se observaron pruebas de antagonismo cuando se utilizó taxol simultáneamente contra las líneas celulares NC1-H226 y NC1-H23 NSCL y doxorubicina contra la línea celular del tumor rhabdomioma RHI.

10 Ejemplo 5

Interacción entre ET-743 y otros agentes antineoplásicos

15 Aunque la ET-743 está sometida actualmente a ensayos clínicos en cánceres humanos, los mecanismos de la actividad antitumoral de ET-743 no han sido completamente aclarados. El objetivo de este estudio era valorar la naturaleza de la interacción entre ET-743 y otros agentes antineoplásicos (doxorubicina; DXR, trimetrexato; TMTX y paclitaxel; taxol) utilizando el método del índice de combinación (abreviadamente en lo sucesivo **IC**) de Chou y Talalay. Para comprender mejor como podría utilizarse clínicamente ET-743, el presente estudio utilizó ensayos con SRB (sulforodamina B) para examinar la citotoxicidad que resulta de combinar ET-743 con otros tres agentes antineoplásicos en los diferentes programas de administración en las dos líneas celulares de sarcomas de tejidos blandos, HT-1080 y HS-18, *in vitro*. DXR fue el único agente que dio como resultado una sinergia independiente de la secuencia cuando se combinó con ET-743. La exposición simultánea de ET-743 con DXR dio como resultado interacciones sinérgicas en ambas líneas celulares.

20 Los valores del IC (valores medios) con dicho programa fueron 0,86, 0,83, 0,84 y 0,85 a una mortandad celular del 50, 75, 90 y 95%, respectivamente, en células HT-1080 y 0,89, 0,74, 0,64 y 0,60 a una mortandad celular del 50, 75, 90 y 95%, respectivamente, en células HS-18. La secuencia de ET-743 durante 24 h antes de DXR fue el régimen más eficaz contra ambas líneas celulares; dio como resultado un IC consecuentemente bajo de hasta un nivel de mortandad celular del 90% para ambas líneas celulares. La exposición a taxol antes de a ET-743 fue también un régimen eficaz. Estos resultados sugieren que la combinación de ET-743 y DXR debe ser más explorada en ensayos clínicos en el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos.

Materiales y métodos

30 Productos químicos

La ET-743 la proporcionó Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, Madrid, España) y se preparó como una solución madre 2 mM en dimetilsulfóxido. Paclitaxel y DXR fueron adquiridas a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). TMTX fue suministrada por Warner-Lambert (Parke-Davis, Ann Arbor, Mich).

Cultivo celular

35 Las líneas celulares de sarcoma de tejidos blandos, HT-1080 y HS-18 se mantuvieron como cultivos en monocapas en RP<I-1640 que contenía suero bovino fetal al 10%.

Ensayo de citotoxicidad con SRB

La citotoxicidad a fármacos se determinó por el ensayo de citotoxicidad con SRB realizado en placas de microvaloración de 96 pocillos como se ha descrito. Las células se extendieron en forma de placas en pocillos por duplicado (5000 células/pocillo) y se expusieron a los fármacos a diferentes concentraciones. Se fijaron las células con una solución de TCA al 50% durante 1 h y se añadió a cada pocillo SRB al 0,4% (Sigma). Después de una incubación de 30 min, se lavó la placa con ácido acético al 1% y se realizó una lectura a 570 nm en un lector de microplacas Biowhitaker 2001. Como controles positivos y negativos se utilizaron respectivamente pocillos con células que no contenían fármacos y pocillos que contenían el medio más los fármacos pero sin células.

Exposición simultánea a ET-743 y DXR, TMTX o Paclitaxel

Se sembraron células en placas de 96 pocillos, como se ha descrito anteriormente. Las células se trataron con siete concentraciones diferentes de los fármacos solos o combinaciones a una relación molar 1:100 (ET-743:los otros fármacos). Después de una exposición de 72 h, se midió la inhibición del crecimiento utilizando el ensayo con SRB.

Exposición secuencial a ET-743 y DXR, TMTX o Paclitaxel

Utilizando el mismo sistema experimental antes descrito, las células se expusieron a tres concentraciones diferentes de los fármacos representadas por  $CI_{25}$ ,  $CI_{50}$ ,  $CI_{75}$  de ET-743, DXR, TMTX y paclitaxel, respectivamente. Después de 24 horas de tratamiento previo con ET-743 o un fármaco de la combinación, se añadió el segundo fármacos a los pocillos respectivos durante 48 h. La inhibición del crecimiento se determinó utilizando el ensayo con SRB.

Análisis del ciclo celular

Se trataron células con crecimiento exponencial con o sin fármacos durante varias horas. A continuación se recogieron las células y se fijaron con metanol al 70% enfriado con hielo y el DNA se tiñó con yoduro de propidio como se ha descrito anteriormente. Se analizaron diez mil células teñidas con un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) Becton Dickinson.

Determinación de la sinergia y el antagonismo y construcción de isobogramas

El IC se calculó por la ecuación de Chou-Talalay, que tiene en cuenta tanto la potencia ( $D_m$  o  $CI_{50}$ ) como la forma de la curva dosis-efecto (el valor  $m$ ). La ecuación general del isobograma clásico ( $IC = 1$ ) es:

$$IC = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

donde  $(Dx)_1$  y  $(Dx)_2$  en los denominadores son las dosis (o concentraciones), siendo  $D_1$  (ET-743) y  $D_2$  (otro fármaco) solas las dosis que proporcionan una inhibición del X %, mientras que  $(D)_1$  y  $(D)_2$  en los numeradores son las dosis de ET-743 y otro fármaco en combinación que inhiben también el X % (es decir, la misma eficacia).  $IC < 1$ ,  $IC = 1$ ,  $IC > 1$  indicaban sinergia, efecto aditivo y antagonismo, respectivamente.

La  $(Dx)_1$  o  $(Dx)_2$  se puede calcular fácilmente a partir de la ecuación del efecto mediana de Chou y Chou et al:

$$Dx = Dm [fa / (1 - fa)]^{1/m} \quad (B)$$

donde  $D_m$  es la dosis del efecto mediana que se obtiene a partir del antilogaritmo de la abscisa en el origen de la gráfica del efecto mediana,  $X - \log(D)$  frente a  $Y - \log[fa / (1 - fa)]$  o  $D_m = 10^{-(ordenada en el origen) / m}$ , y  $m$  es la pendiente de la gráfica de la dosis eficaz mediana. El programa informático de Chou y Chou permite el cálculo automático de los valores de  $m$ ,  $D_m$ ,  $Dx$  y  $CI$ . A partir de  $(D_m)_1$ ,  $(Dx)_2$  y  $D_1 + D_2$ , se construyen fácilmente los isobogramas basándose automáticamente en la ecuación A.

Para isobogramas mutuamente no exclusivos conservadores de dos agentes, se añade a la ecuación A un tercer término

$$(D_1) (D_2) / (DX)_1 (DX)_2 \quad (C)$$

Por simplicidad, generalmente se omite este tercer término y por tanto se indica la suposición mutuamente exclusiva o isobograma clásico. En los resultados 2 y 3, se dan los valores de IC obtenidos del cálculo clásico (mutuamente exclusivo).

Resultado 1

45

Citotoxicidad de cuatro fármacos sobre HT-1080 y S 18			
CI <sub>50</sub> de células de sarcoma de tejidos blandos humano			
		HT-1080	HS-18
ET-743	(nM)	0,01	0,27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70000
Paclitaxel	(nM)	1:3	10

Esta tabla mostró que tanto las líneas celulares HT-1080 como las S18 eran más sensibles a ET-743 que otros agentes antineoplásicos.

5

Efecto de cada agente sobre la distribución del ciclo celular contra células HS-18					
24 h y 72 h después de tratamiento con dosis de aproximadamente CI <sub>50</sub>					
Fármacos	Dosis	Horas	% de G1	% de Fase S	% de G2-M
Control			76,3	11,2	12,5
ET-743	270 pM	24	32,4	47,6	20,0
DXR	225 nM	24	10,1	64,9	25,0
TMTX	70 µM	24	44,2	53,8	1,9
Paclitaxel	10 nM	24	32,8	52,5	15,5
		72	23,5	58,7	26,2

Efecto de cada agente sobre la distribución del ciclo celular contra células HT-1080					
24 h y 72 h después de tratamiento con dosis de					
Fármacos	Dosis	Horas	% de G1	% de Fase S	% de G2-M
Control			47,5	35,8	16,7
ET-743	10 pM	24	42,6	36,1	21,3
		72	38,4	48,8	12,7
DXR	25 nM	24	36,1	17,5	46,4
		72	40,8	5,8	49,5
TMTX	6 nM	24	31,9	56,8	11,3
		72	32,0	53,7	14,4
Paclitaxel	1,3 nM	24	45,4	37,3	17,3
		72	38,8	38,8	22,4

El resultado 2 muestra el IC para las células HT-1080 y HS-18, respectivamente, que fueron expuestas simultáneamente a ET-743 y uno de los fármacos antineoplásicos, tal como DXR, TMTX o paclitaxel, a una combinación con una relación molar de 1 a 100. Cuando las células se trataron con ET-743 y DXR, los valores de IC eran inferiores a

10

1, lo que indica un efecto sinérgico en ambas líneas celulares. Los IC (valores medio) con este calendario fueron 0,86, 0,83, 0,84 y 0,85 a una mortandad celular del 50, 75, 90 y 95%, respectivamente, en células HT-1080 y 0,89, 0,74, 0,64 y 0,60 a una mortandad celular del 50, 75, 90 y 95%, respectivamente, en células HS-18. Este resultado mostró que el tratamiento simultáneo de ET-743 y DXR produjo un efecto citotóxico sinérgico. En contraste, cuando las células se trataron con ET-743 y TMTX o paclitaxel, se observó un efecto citotóxico antagonista.

Se obtuvo una representación gráfica de los IC a partir de ambas líneas celulares que fueron expuestas inicialmente a ET-743 durante 24 h, seguida de una exposición a DXR durante 48 h. En ambas líneas celulares, el tratamiento con ET-743 seguido de DXR mostró un efecto citotóxico sinérgico, siendo el valor de IC de HT-1080, a una mortandad celular del 80%,  $0,64 \pm 0,12$  y el de HS-18, a un nivel de mortandad celular del 88%,  $0,24 \pm 0,06$ . En contraste, el tratamiento con DXR seguido de ET-743 (Resultado 3a, figura inferior) demostró a primera vista el buen valor del IC. Sin embargo el valor del IC de HT-1080 a un nivel de mortandad celular del 80% fue  $1,00 \pm 0,03$ , lo que indica que el efecto de los dos agentes era aditivo, además, en ambas células el IC a una fracción de mortandad más alta era peor que a una fracción de mortandad media.

Cuando las células fueron expuestas a ET-743 seguida de exposición a TMTX, los valores del IC de HT-1080 se mostraron próximos a uno o por encima de uno, lo que indica que el efecto de los dos agentes era antagonista o aditivo. En contraste, los de HS-18 eran todos inferiores a 0,6, lo que demuestra que estos dos fármacos tienen efecto sinérgico. Cuando las células se trataron con TMTX seguido de ET-743, se observó un efecto aditivo tanto en las líneas celulares HT-1080 como HS-18.

El tratamiento con paclitaxel seguido de ET-743 produjo un efecto citotóxico sinérgico. Cuando las células se expusieron a paclitaxel seguida de exposición a ET-743, el valor del IC de HT-1080 a un nivel de mortandad celular del 89% fue  $0,92 \pm 0,06$  y el de HS-18 a un nivel de mortandad celular del 78% fue  $0,38 \pm 0,13$ .

#### Sumario

La ET-743 era muy activa contra las células de sarcoma de tejidos blandos humano, especialmente contra la línea celular de fibrosarcoma maligno HT-1080.

La DXR dio como resultado una sinergia independiente de la secuencia cuando se combinó con ET-743, sin embargo, la secuencia de ET-743 seguida de DXR era la más eficaz contra ambas líneas celulares.

La exposición a paclitaxel seguida de exposición a ET-743 era también un régimen eficaz contra las células de sarcoma de tejidos blandos humano, mientras que la exposición simultánea era antagónica.

#### Ejemplo 6

Combinaciones *in vivo* de agentes quimioterapéuticos con ecteinascidina 743 (ET-743) contra tumores sólidos.

Se han descrito diversos mecanismos de acción únicos para ET-743 incluyendo la unión a la ranura menor de DNA, alquilación del N2 de la guanina, inhibición transcripcional del gen MDR1 (Jin et al., PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo et al., PNAS 97, 6780, 2000) y el contrarrestado de la activación del receptor nuclear SXR (Synold et al., Nature Med 7, 584, 2001). Como un único agente, ET-743 inhibe *in vivo* el crecimiento tumoral consiguiendo remisiones completas (RC) contra diversas cepas tumorales humanas (Hendriks et al., Ann. Oncol. 10, 1233, 1999) incluyendo melanoma (MEXF 989), carcinoma NSCL (LXFL 529), de ovario (HOC 22) y de mama (mix-1). La eficacia de ET-743 en combinación con fármacos que actúan por mecanismos alternativos puede proporcionar oportunidades para reducir las toxicidades de cada fármaco o potenciar la eficacia de un fármaco en cánceres resistentes o recurrentes.

Para esta evaluación se administraron diversos agentes incluyendo doxorubicina (DOY, 8 mg/kg), cisplatino (DDP; 12 mg/kg) y vinblastina (VINB; 6 mg/kg) antes/después de ET-743 (0,2 mg/kg) con un tratamiento previo de 1 hora, qdx5, en uno o más de los siguientes tumores: condrosarcoma (CSHA), osteosarcoma (OSA-FH), fibrosarcoma (SW684), de ovario (MRIH-1834), de NSCL (LX-1) y renal (MRI-H-121) con actividad definida como < 50% T/C. En el modelo de fibra hueca (FH), la secuencia de DOX, 1 h de tratamiento previo con ET-743 era consecuentemente más eficaz que ET-743 sola en condrosarcoma (6% frente a 10%), fibrosarcoma (33% frente a 48%) y osteosarcoma (20% frente a 34%). Los xenoinjertos de osteosarcoma produjeron resultados similares del 17% frente al 43%. Estudios de FH con DPP mostraron que ET-743 pre-DDP era más eficaz que ET-743 sola en tumores de ovario (28% frente a 100%) y condrosarcoma (15% frente a 19%) y actividades equivalente en osteosarcoma (36% T/C). Los datos del xenoinjerto confirman que la secuencia de ET-743 pre-DDP es más eficaz que ET-743 sola (35% frente a 66%). La única excepción fue en NSCL donde ET-743 sola no era activa (62% T/C) pero DPP seguida de ET-743 produjo RC (<1% T/C). En xenoinjertos renales, ET-743 sola era muy activa (22% T/C) pero ET-743 seguida de VINB produjo también CR (<1% T/C). Están en marcha estudios separados con otros agentes estándares en xenoinjertos de tumores de mama, renales, melanoma y gástricos.

#### Ejemplo 7

Actividad preclínica y biodistribución de combinaciones de ecteinascidina 743 (ET-743) y doxorubicina (DOX) en rabadomiosarcoma humano.

La ET-743 es la primera de una nueva clase de agentes antitumorales que presentan actividad antitumoral. La ET-743 ha mostrado actividad en pacientes con sarcoma que no responden al tratamiento con DOX e ifosfamida. En vista de su potencial como un fármaco eficaz, los autores de la presente invención investigaron:

(1) la actividad antitumoral preclínica de la combinación ET-743/DOX contra el rhabdomyosarcoma humano TE 671 y

5 (2) posibles interacciones entre los fármacos y su biodistribución en ratones atímicos y xenoinjertos tumorales.

*In vitro*: el efecto de cada fármaco o combinación después de exposición de 1 h se evaluó por ensayo clonogénico. ET-743 o DOX solas mostraban actividad antitumoral contra células TE 671. La combinación de acuerdo con el análisis del isoblograma y el índice de combinación, era al menos aditiva en diversas líneas de células tumorales incluyendo TE 671.

10 *In vivo*: se administraron tratamientos i.v solos (ET-743, 0,1mg/kg; DOX, 10mg/kg) a ratones atímicos cuando los tumores xenoinjertados pesaban aproximadamente 100 mg. Los valores de inhibición del peso tumoral/mortandad celular logarítmica fueron 46%/0,132 para ET sola, 50%/0,33 para DOX sola, 77%/0,924 para ET-743 y DOX administradas simultáneamente, 82%/1,12 para la combinación de ET-743 administrada 1 hora antes que DOX y 75%/0,85 cuando ET-743 se administró 1 hora después de DOX. También se observó un efecto sinérgico contra el fibrosarcoma de múridos UV2237 y contra su sublínea resistente a múltiples fármacos UV2237/ADR.

Estos datos muestran un efecto sinérgico de ET-743/DOX y parece que es independiente de la secuencia o combinación de fármacos en los casos estudiados hasta ahora. Ni las concentraciones en el plasma ni en los tumores de DOX son significativamente diferentes cuando DOX se administró sola o en combinación con ET-743. La evaluación farmacocinética (PK) de ET-743 administrada sola o en combinación con DOX está en curso. La combinación de ET-743 y DOX parece aditiva *in vitro* pero sinérgica *in vivo* en rhabdomyosarcoma TE 671. El perfil farmacocinético de DOX no está influenciado por el tratamiento simultáneo con ET-743. Estos datos proporcionan una base para utilizar esta combinación en ensayos clínicos tempranos.

#### Ejemplo 8

25 ET-743 y cisplatino (DDP) muestran sinergia *in vitro* e *in vivo* contra líneas celulares de sarcoma y carcinoma de ovarios humanos.

Los autores de la presente invención muestran que ET-743 mejora la actividad de DDP tanto *in vitro* como *in vivo*. En diversas líneas celulares cancerígenas incluyendo carcinoma intestinal humano (HCT116), carcinoma de ovario (Igrov-1, A2780), sus sublíneas resistentes (Igrov-1/PSC-ET y 1A9, respectivamente) y rhabdomyosarcoma (TE671), concentraciones menores de ET-743 utilizadas como un solo agente podrían potenciar la actividad de DDP al menos el doble. Concentraciones correspondientes a  $Cl_{30}/Cl_{50}$  de ET-743 dieron como resultado efectos aditivos o sinérgicos. Estos resultados han llevado a estudios *in vivo* utilizando modelos de xenoinjertos para estudiar las combinaciones eficaces de fármacos con ET-743.

35 En TE 671 transplantado subcutáneamente, parcialmente sensible a ET-743 y DDP, la combinación de los dos fármacos produjo un efecto antitumoral mucho mayor que la conseguida con cada fármaco utilizado a sus niveles respectivos de MTD. El tumor de ovarios 1A9 que normalmente es resistente tanto a ET-743 como a DDP como agentes solos, en combinación produjeron una inhibición del crecimiento tumoral mayor del 50%. El carcinoma de ovarios humano HOC<sub>8</sub> transplantado ortotópicamente, que produce nódulos tumorales en la cavidad peritoneal con ascitis, que es resistente a ET-743 y parcialmente sensible a DDP, en combinación dio como resultado un aumento drástico de la supervivencia incluso a la dosis de ET-743 de 0,05 mg/kg ( $1/4$  MTD) y no provocó ninguna toxicidad significativa. Una dosis de ET-743 de 0,15 mg/kg aumentó notablemente la supervivencia, pero también aumentó la toxicidad como indicó la pérdida de peso, que fue significativamente mayor que la observada después de tratamiento con cada fármaco.

Estos hallazgos ofrecen una base fuerte para diseñar ensayos clínicos utilizando la combinación de ET-743 y DDP en sarcomas y cánceres de ovario. Están en curso estudios *in vitro* e *in vivo* para ilustrar los mecanismos que ponen de manifiesto la sinergia entre ET-743 y DDP en estos tipos de cáncer.

#### 45 Ejemplo 9

La dexametasona (Dex) en altas dosis protege contra la hepatotoxicidad de la ecteinascidina-743 (ET-743) en la rata

La ET-743, un agente procedente de un tunicado marino, está actualmente en la fase II de ensayos clínicos. Ha mostrado actividad contra los sarcomas y los datos preliminares sugieren actividad contra el carcinoma de mama y ovarios. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes tratados se da una hepatotoxicidad caracterizada por transaminitis reversible y en una minoría colestasis. En las especies de animales más sensibles, la rata, la toxicidad de ET-743 se caracteriza por necrosis hepática e inflamación de las vías biliares. Debido a la actividad antiinflamatoria de Dex, los autores de la presente invención investigaron su efecto sobre las lesiones hepáticas inducidas por ET-743 en la rata. Ratas Wistar hembras recibieron una sola dosis i.v de ET-743 (40  $\mu$ g/kg). Algunas ratas fueron tratadas previamente con una sola dosis de Dex de 1, 5, 10 o 20 mg/kg, 24 horas antes del tratamiento con ET-743. Se evaluaron la patología hepática y las concentraciones en plasma de fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (GOT) y

bilirrubina total (TB) hasta 3 días después de la administración de ET-743. Se examinaron por microscopio óptico las secciones histológicas convencionales de los hígados.

5 2 días después del tratamiento con ET-743, los hígados de las ratas que recibieron ET-743 sola mostraron inflamación de las vías biliares, cambios degenerativos sorprendentes en las células epiteliales biliares y zonas de necrosis hepáticas. Los niveles en el plasma de ALP y GOT se elevaron significativamente al cabo de 2 días. La colestasis se reflejó por un aumento drástico en las concentraciones de TB en el plasma, que comenzó a los 2 días de la administración de ET-743. Los cambios histopatológicos inducidos por ET-743 y la elevación de ALP, GOT y TB en el plasma no se dieron en absoluto en las ratas tratadas previamente con 10 o 20 mg/kg de Dex.

10 Aunque Dex a 1 mg/kg mostraba poca protección, a 5 mg/kg era moderadamente protectora. Los niveles en plasma de ET-743 en ratas que recibieron diariamente Dex (50 mg/kg) durante 3 días antes de ET-743 no disminuyeron en comparación con los de ratas a las que se había administrado ET-743 sola. Además, la actividad de ET-743 contra el melanoma B16 implantado en ratones no fue impedida por la dexametasona. Estos descubrimientos sugieren que la adición de dexametasona en altas dosis al régimen de ET-743 puede mejorar su hepatotoxicidad en pacientes con cáncer.

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de una combinación sinérgica de ET-743 y otro fármaco seleccionado de un fármaco antraciclínico, un fármaco de platino, un fármaco que tiene como diana una topoisomerasa, un fármaco del grupo de los taxanos, un fármaco antimetabolito o un fármaco antimicótico oral en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y doxorubicina.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y cisplatino.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y paclitaxel.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y gemcitabina.
- 10 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y SN-38.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y trimetrexato.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia de combinación emplea ET-743 y vinblastina.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4 o 7, para el tratamiento de sarcoma.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 6 para el tratamiento de cáncer de colon.
- 15 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 para el tratamiento de carcinoma intestinal.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 6 para el tratamiento de cáncer de pulmón.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 para el tratamiento de cáncer de mama.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento de cáncer renal.
- 20 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde ET-743 y el otro fármaco se proporcionan como un solo medicamento.
16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde ET-743 y el otro fármaco se proporcionan como medicamentos separados.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el medicamento separado que contiene ET-743 es para la administración al mismo tiempo que el medicamento que contiene el otro fármaco.
- 25 18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el medicamento separado que contiene ET-743 es para la administración en un momento diferente del medicamento que contiene el otro fármaco.
19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el otro fármaco o la combinación se suministra por liposoma o encapsulación en nanoesferas.
- 30 20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la terapia de combinación emplea además dexametasona.
21. Una combinación sinérgica de ET-743 y otro fármaco seleccionado de un fármaco antraciclínico, un fármaco de platino, un fármaco que tiene como diana una topoisomerasa, un fármaco del grupo de los taxanos, un fármaco antimetabolito o un fármaco antimicótico oral para uso en el tratamiento de un tumor como se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.