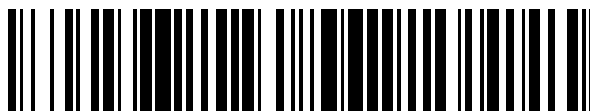


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 828**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05853820 .8**
96 Fecha de presentación: **13.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1827437**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **COMBINACIONES DE AGENTES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:
15.12.2004 US 636439 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

73 Titular/es:
**SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 Rome, IT**

72 Inventor/es:
**ZAKNOEN, Sara;
WOO, Margaret Ma;
VERSACE, Richard William;
PISANO, Claudio y
VESCI, Loredana**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 828 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

Combinaciones de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer

Antecedentes de la invención

5 La camptotecina y los derivados de la misma son agentes citotóxicos que exhiben actividad antitumoral principalmente mediante la inhibición de la topoisomerasa I, una diana farmacológica clínicamente validada que normalmente se sobreexpresa en células malignas. La camptotecina y sus derivados actúan interfiriendo en el desenrollado del ADN superenrollado por la enzima celular topoisomerasa I, que desencadena acontecimientos que conducen a la apoptosis y muerte celular programada de las células malignas.

10 Skikawa, Takashi y col. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2001, (41) 252; y 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2001, 24-88 divulgan mecanismos de tipo sinergia en quimioterapia de combinación de un nuevo derivado de pirazoloacridona.

15 Sartore-Bianchi, Andrea y col. Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2003, 742-743; y 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2003, 11-14 divulgan la combinación del nuevo análogo de la camptotecina Gimatecán (ST 1481) más el inhibidor del proteasoma PS341 en la producción de un efecto pro-apoptótico potenciado en una línea celular de mesotelioma maligno.

El documento WO 2004/103358 A2 divulga la combinación de inhibidores de la histona desacetilasa con agentes quimioterapéuticos.

Perego, P. y col. European Journal of Cancer, 2004, 2(8), 156 divulga la potenciación de la sensibilidad celular al inhibidor de la ADN topoisomerasa I gimatecán mediante TRAIL en células de carcinoma de próstata.

Resumen de la invención

20 En la actualidad se ha descubierto que, sorprendentemente, los derivados de camptotecina son incluso más eficaces cuando se usan en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Presentan ventajas tanto sinérgicas como aditivas, tanto para la eficacia como para la seguridad. Los efectos terapéuticos de las combinaciones de agentes quimioterapéuticos con un derivado de camptotecina pueden tener como resultado menores intervalos de dosis seguras de cada componente de la combinación.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
- (b) carboplatino.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- 30
- (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) cisplatino
- para su uso secuencial.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- 35
- (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) Epotilona B.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
- (b) everolimus.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- 40
- (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina.

La expresión "agente activo de microtúbulos", como se usa en el presente documento, se refiere a agentes estabilizantes de microtúbulos, desestabilizantes de microtúbulos e inhibidores de la polimerización de la

microtubulina, incluidos, entre otros, taxanos, por ejemplo paclitaxel y docetaxel; alcaloides de la vinca, por ejemplo vinblastina, especialmente sulfato de vinblastina; vincristina, especialmente sulfato de vincristina y vinorelbina; discodermólidos; colchicina y epotilonas y derivados de las mismas, por ejemplo epotilona B o un derivado de la misma. El paclitaxel está comercializado como TAXOL; docetaxel como TAXOTERE; sulfato de vinblastina como VINBLASTIN R.P.; y sulfato de vincristina como FARMISTIN. También se incluyen las formas genéricas de paclitaxel, así como varias formas de dosificación de paclitaxel. Las formas genéricas de paclitaxel incluyen, entre otros, clorhidrato de betaxolol. Varas formas de dosificación incluyen, entre otros, paclitaxel en nanopartículas con albúmina comercializado como ABRAXANE; ONXOL, CYTOTAX. El discodermólido se puede obtener, por ejemplo, como se divulga en la patente de EE.UU. 5,010,099. También se incluyen los derivados de epotilona, que se divulgan en la patente de EE.UU. n° 6.194.181, los documentos WO 98/10121, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 y WO 00/31247. Especialmente preferidas son las epotilonas A y/o B.

La expresión "compuesto de platino", como se usa en el presente documento, incluye, entre otros, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, satraplatino y agentes de platino, tales como ZD0473. El carboplatino se puede administrar, por ejemplo, en la forma en la que está comercializado, por ejemplo CARBOPLAT; y el oxaliplatino como ELOXATIN.

Los compuestos dirigidos, que disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo- o heterodímeros), tales como los compuestos que apuntan, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico son, especialmente, compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben los miembros de la familia de receptores tirosina quinasa del EGF, por ejemplo receptor de EGF, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 o se unen a EGF o a ligandos relacionados con EGF y son, en concreto, los compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales genérica y específicamente divulgados en el documento WO 97/02266, por ejemplo el compuesto del Ejemplo 39, o en los documentos EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, la patente de EE.UU. n° 5.747.498, los documentos WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 y, especialmente el documento, WO 96/30347, por ejemplo un compuesto conocido como CP 358774, el documento WO 96/33980, por ejemplo el compuesto ZD 1839; y el documento WO 95/03283, por ejemplo el compuesto ZM105180, por ejemplo trastuzumab (HERCEPTIN), cetuximab, Iressa, OSI-774, CI-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 o E7.6.3, y {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina, erlotinib y gefitinib. Erlotinib se puede administrar en forma de su marca, por ejemplo TARCEVA, y gefitinib como IRESSA, anticuerpos monoclonales humanos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico, incluido ABX-EGFR.

Compuestos dirigidos, que disminuyen o inhiben la actividad/función de la serina/treonina mTOR quinasa son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que apuntan/inhiben miembros de la familia de la mTOR quinasa, por ejemplo RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, rapamicina y derivados/análogos de los mismos, AP23573 y AP23841 de Ariad, everolimus (CERTICAN) y sirolimus. CERTICAN (everolimus, RAD) es un nuevo inhibidor de la señal de proliferación en investigación que evita la proliferación de las células T y las células de músculo liso vascular.

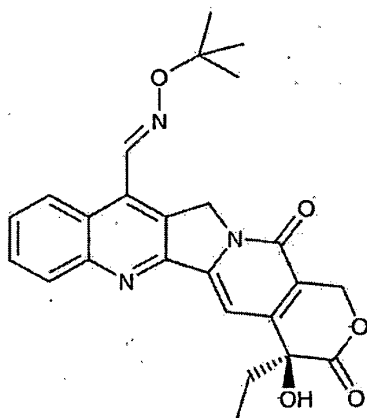
Los compuestos usados como ingredientes activos en las combinaciones divulgados en el presente documento se pueden preparar y administrar como se ha descrito en los documentos citados en el presente documento, respectivamente.

La estructura de los agentes activos identificados mediante códigos numéricos, nombres genéricos o comerciales, se pueden tomar de la edición actual del compendio convencional "The Merck Index" o de bases de datos, por ejemplo de patentes internacionales, por ejemplo IMS World Publications, o las publicaciones mencionadas anteriormente y más adelante.

Debe entenderse que las referencias a los compuestos (a) y (b) están destinadas a incluir también las sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias activas. Si las sustancias activas compuestas por los componentes (a) y/o (b) tienen, por ejemplo, al menos un centro básico, pueden formar sales de adición de ácido. Las correspondientes sales de adición de ácido también se pueden formar teniendo, si se desea, un centro básico adicional. Las sustancias activas que tienen un grupo ácido, por ejemplo COOH, pueden formar sales con bases. Las sustancias activas compuestas por los componentes (a) y/o (b) o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas pueden también usarse en forma de un hidrato o incluir otros disolventes usados para cristalización. La 7-t-butoxiiminometilcamptotecina es la pareja de combinación más preferida (a).

Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son, en caso de los átomos de nitrógeno que tienen carácter básico, las sales con ácidos farmacéuticamente aceptables, tanto inorgánicos como orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido acético; o, en el caso del grupo ácido, tal como carboxilo; las sales con bases farmacéuticamente aceptables, tanto inorgánicas como orgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos alcalinos y alcalino-térreos; hidróxido amónico; amina; y también los heterocíclicos.

En la presente invención, el derivado de camptotecina es 7-t-butariminometilcamptotecina, que tiene la estructura siguiente:



Los derivados de camptotecina de fórmula (I) y su preparación se divulgan en la patente de EE.UU. nº 6.242.457.

- 5 La administración simultánea puede, por ejemplo, tener lugar en forma de una combinación fija con dos o más ingredientes activos o mediante administración simultánea de dos o más ingredientes activos que se formulan de forma independiente. El uso (administración) secuencial significa, preferentemente, la administración de uno (o más) componentes de una combinación en un punto temporal, otros componentes en un instante diferente, es decir de un modo crónicamente escalonado, de un modo tal que, preferentemente, la combinación muestra más eficiencia que los compuestos únicos administrados de forma independiente (que especialmente muestran sinergia). El uso (administración) separado significa, preferentemente, la administración de los componentes de la combinación de forma independiente entre sí en puntos de tiempo diferentes.

Asimismo, las combinaciones de dos o más administraciones secuenciales, separadas y simultáneas son posibles, preferentemente de modo que los fármacos componentes de la combinación muestran un efecto terapéutico conjunto que supera el efecto hallado cuando los fármacos componentes de la combinación se usan de forma independiente a intervalos de tiempo tan grandes que no se puede encontrar un efecto mutuo sobre su eficiencia terapéutica, siendo especialmente preferido un efecto sinérgico.

La expresión "retraso de la progresión", como se usa en el presente documento, significa la administración de la combinación a pacientes en una etapa previa o en una fase temprana, de las primeras o posteriores manifestaciones; o una recaída de la enfermedad que se va a tratar en dichos pacientes, por ejemplo se diagnostica una forma previa de la correspondiente enfermedad; o pacientes que están en un estado, por ejemplo durante un tratamiento médico o un trastorno resultante de un accidente, bajo el cual es probable que se desarrolle una enfermedad correspondiente.

"Activo terapéuticamente conjunto" o "efecto terapéutico conjunto" significa que los compuestos se pueden administrar por separado (de un modo crónicamente escalonado, especialmente de un modo específico de secuencia) en intervalos de tiempo tales que, preferentemente, el animal de sangre caliente, especialmente un ser humano, que se va a tratar, todavía muestra una interacción (preferentemente sinérgica) (Efecto terapéutico conjunto).

"Farmacéuticamente eficaz" se refiere, preferentemente, a una cantidad que es terapéuticamente, o en un sentido más amplio, también profilácticamente eficaz contra la progresión de una enfermedad proliferativa.

En el caso del uso de la combinación de los componentes (a) y (b), cualquier combinación de uso simultáneo, secuencial y separado también es posible, lo que significa que los componentes (a) y (b) pueden administrarse en un instante determinado de forma simultánea, seguido de la administración de sólo un componente con toxicidad inferior para el huésped bien crónicamente, por ejemplo más de 3-4 semanas de dosis diaria, en un instante posterior y, después, el otro componente o la combinación de ambos componentes, en un instante todavía más tarde (en posteriores cursos de tratamiento de combinación de fármacos por aun efecto anti-tumoral óptimo) o similares.

Las composiciones de la invención también se pueden aplicar en combinación con otros tratamientos, por ejemplo intervención quirúrgica, hipertermia y/o radioterapia.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por medios convencionales y son los adecuados para administración enteral, tal como oral o rectal, y parenteral a mamíferos, incluido el ser humano, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de camptotecina y al

menos un agente quimioterapéutico solo o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, especialmente los adecuados para aplicación enteral o parenteral.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente del 0,00002 % a aproximadamente el 100 %, especialmente, por ejemplo en el caso de diluciones para infusión que están listas para usar) del 0,0001 - 0,02 %, o, por ejemplo, en el caso de concentrados para inyección o infusión o, especialmente, formulaciones parenterales, de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 95 %, preferentemente de aproximadamente el 1 % al aproximadamente 90 %, más preferentemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 %, del ingrediente activo (peso en peso, en cada caso). Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en, por ejemplo, forma de monodosis, tal como en forma de ampollas, viales, grageas, comprimidos, bolsas de infusión o cápsulas.

La dosis eficaz de cada una de las parejas de la combinación empleadas en una composición de la presente invención puede variar en función del compuesto concreto o las composiciones farmacéuticas empleadas, del modo de administración, de la afección que se esté tratando y de la gravedad de la afección que se esté tratando. Un médico, clínico o veterinario experto en la técnica puede determinar con facilidad la cantidad eficaz de cada uno de los ingredientes activos necesarios fármaco para prevenir, tratar o inhibir la progresión de la enfermedad.

En el caso en el que se selecciona el agente quimioterapéutico del grupo consistente en doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, epotilonas y derivados de los mismos, temozolamida, 5-FU; gemcitabina, oxaliplatino, carboplatino, derivados de 7H-pirrol-[2,3-d]pirimidina, compuestos de isocinolina, RAD001, GLEEVEC, erlotinib, bevacizumab, cetuximab, velcade, N-hidroxi-3-[4-[(2-hidroxi-etil)]2-(1H-indol-3-il)etil]-amino]metil]fenil]-2E-2-propenamida y derivados de 4-amino-5-fenil-7-ciclobutil-pirrol[2,3-d]pirimidina, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos; ésteres de profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos; y el paciente que se va a tratar es un ser humano, una dosis adecuada de, por ejemplo, 5-FU se administra a una dosis adecuada en el intervalo de 100 - 1500 mg diarios, por ejemplo 200-1000 mg/día, tal como 200, 400, 500, 600, 800, 900 o 1000 mg/día, administrados en una o dos dosis diarias. El 5-FU se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis variable de aproximadamente - 1000 mg/m²/día, por ejemplo 500 mg/m²/día. Entre los inhibidores de la topoisomerasa II, DOXORUBICINA se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis variable de aproximadamente 10- 100 mg/m²/día, por ejemplo 25 o 75 mg/m²/día, por ejemplo en una sola dosis. PACLITAXEL se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis variable de aproximadamente 50 - 300 mg/m²/día. DOCETAXEL se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis variable de aproximadamente 25 - 100 mg/m²/día. CARBOPLATINO se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis variable de aproximadamente 200 - 400 mg/m² aproximadamente cada cuatro semanas. OXALIPLATINO se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis variable de aproximadamente 50 - 85 mg/m² cada dos semanas.

Las preparaciones farmacéuticas para la terapia de combinación para administración enteral o parenteral son, por ejemplo, las que están en formas de monodosis, tales como comprimidos recubiertos por azúcar, cápsulas o supositorios, y, además, ampollas. Si no se indica lo contrario, estas formulaciones se prepararan por medios convencionales, por ejemplo por medio de procedimientos convencionales de mezclado, granulado, recubrimiento de azúcar, disolución o liofilización. Se apreciará que el contenido de la unidad de una pareja de combinación contenido en una dosis individual de cada forma de dosificación no necesita constituir por sí misma una cantidad eficaz, ya que se puede alcanzar la cantidad eficaz necesaria mediante administración de una pluralidad de monodosis. Un experto en la técnica tiene la capacidad de determinar cantidades farmacéuticamente eficaces adecuadas de los componentes de la combinación.

Preferentemente, los compuestos o las sales farmacéuticas aceptables de los mismos, se administran como una formulación farmacéutica oral en forma de un comprimido, cápsula o jarabe; o como inyecciones parenterales si es adecuado.

En la preparación de las composiciones para administración oral, se puede emplear cualquier medio farmacéuticamente aceptable, tal como agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes o agentes colorantes. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen almidones, azúcares, celulosas microcristalinas, diluyentes, agentes de granulado, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

Soluciones del ingrediente activo, y también las suspensiones, y especialmente las soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, son útiles para administración parenteral del ingrediente activo, siendo posible, por ejemplo, en el caso de las composiciones liofilizadas que comprenden el ingrediente activo solo o junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo manitol, para producir dichas soluciones o suspensiones antes de usar. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o pueden comprender excipientes, por ejemplo conservantes, estabilizantes, agentes humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o tampones, y se preparan de un modo conocido per se mediante, por ejemplo, medios de procedimientos convencionales de disolución o liofilización. Las soluciones o suspensiones pueden comprender sustancias de incremento de la viscosidad, tal como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa, dextrano,

polivinilpirrolidona o gelatina. Las suspensiones en aceite comprenden, como componente oleoso, los aceites vegetales, sintéticos o semisintéticos habituales para fines de inyección.

5 El agente isotónico se puede seleccionar de cualquiera de los conocidos en la técnica, por ejemplo manitol, dextrosa, glucosa y cloruro sódico. La formulación de la infusión se puede diluir con el medio acuoso. La cantidad de medio acuoso empleado como diluyente se escoge de acuerdo con la concentración deseada del ingrediente activo en la solución para infusión. Las soluciones para infusión pueden contener otros excipientes de uso habitual en las formulaciones para administrar por vía intravenosa, tales como antioxidantes.

Las enfermedades que se van a tratar

10 Las composiciones de la presente invención son útiles para tratar enfermedades proliferativas o enfermedades que se asocian con, o desencadenan mediante, angiogénesis persistente.

15 Una enfermedad proliferativa es, principalmente, una enfermedad tumoral (o cáncer) (y/o cualquier metástasis). Las composiciones de la invención son particularmente útiles para tratar un tumor que es un cáncer de mama; cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer gastrointestinal, incluidos los cánceres esofágico, gástrico, de intestino delgado, de intestino grueso, rectal y de colon; glioma, incluido glioblastoma; sarcoma, tales como los que implican al hueso, el cartílago, los tejidos blandos, el músculo, la sangre y los vasos sanguíneos; cáncer de ovarios; mieloma; cáncer cervical de mujeres; cáncer endometrial; cáncer de cabeza y cuello; mesotelioma; cáncer renal; cáncer de útero; de vejiga urinaria y uretral; leucemia; cáncer de próstata; cánceres de piel, y melanoma. En particular, las composiciones de la invención son particularmente útiles para tratar:

20 i, un tumor de mama; un tumor pulmonar, por ejemplo un tumor pulmonar de células no pequeñas, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP); un tumor gastrointestinal, por ejemplo un tumor colorrectal; o un tumor genitourinario, por ejemplo un tumor de próstata; cáncer de ovarios; glioma, incluido el glioblastoma;

ii. una enfermedad proliferativa que es resistente al tratamiento con otros quimioterapéuticos; o

25 iii. un tumor que es resistente al tratamiento con otros quimioterapéuticos debido a resistencia a múltiples fármacos.

En un sentido más amplio de la invención, una enfermedad proliferativa puede además ser una afección hiperproliferativa, tal como leucemia, linfoma o mieloma múltiple.

30 Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para prevenir o tratar las enfermedades que se desencadenan por angiogénesis persistente, tal como sarcoma de Kaposi, leucemia o artritis,

Cuando se mencionan un tumor, o enfermedad tumoral, un carcinoma o un cáncer, también se implica, alternativamente o en adición, las metástasis en el órgano o tejido original y/o en cualquier otra localización, cualquiera que sea la localización del tumor y/o la metástasis.

35 Las composiciones son, de forma selectiva, tóxicas, o más tóxicas, para las células en proliferación rápida que las células normales, particularmente en células de cáncer humano, por ejemplo tumores cancerosos, el compuesto tiene efectos antiproliferativos significativos y estimula la diferenciación, por ejemplo detención del ciclo celular y apoptosis.

Ejemplo 1: combinación de -t-butoxiiminometilcamptotecina y carboplatino

Procedimientos experimentales in vivo

40 Sistema del ensayo: Se usan ratones CD1 nu/nu hembra para modelos tumorales.

Número de animales: 176 (88 para cada modelo de tumor)

Células A2780/DDP de carcinoma ovárico de platino humano (2x10⁶) se implantan en el flanco derecho de ratones hembra, 8 ratones/grupo se tratan 3 días después de la inyección tumoral con los fármacos siguientes.

1. Vehículo

45 2. 7-t-butoxiiminometilcamptotecina 0,28 mg/10 ml/kg y 0,19 mg/10 ml/kg p.o. (cd x 5/sem, días 3-7)

3. Carboplatino 50 mg/10 ml/kg y 33,3 mg/10 ml/kg, i.p. (c4d x 2, días 3, 7)

4. Grupos de combinación de -t-butoxiiminometilcamptotecina y Carboplatino: 0,28+50, 0,28+33,3, 0,19+50,

0,19+33,3.

Células A2780 de carcinoma ovárico (2x10⁶) se implantan s.c. en el flanco derecho de ratones hembra, 7-8 ratones/grupo se tratan 3 días después de la inyección tumoral con los fármacos siguientes.

1. Vehículo
- 5 2. 7-t-butoxiiminometilcamptotecina 0,28 mg/10 ml/kg y 0,19 mg/10 ml/kg p.o. (cd x 5/sem, días 3-7)
3. Carboplatino 50 mg/10 ml/kg y 33,3 mg/10 ml/kg, i.p. (c4d x 2, días 3, 7)
4. Grupos de combinación: 7-t-butoxiiminometilcamptotecina + carboplatino: 0,26+50, 0,28+33,3, 0,19+50, 0,19+33,3.
5. 7-t-butoxiiminometilcamptotecina 0,19 mg/10 ml/kg, p.o. (cdx5/semx2sem, días 3-7, 10-14).
- 10 6. Carboplatino 50 mg/10 ml/kg i.p. (c7d x 2, días 3, 10).
7. Grupos de combinación: 7-t-butoxiiminometilcamptotecina + carboplatino 0,19+50.

Células NCI-H460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas (3x10⁶) se implantan en el flanco derecho de ratones hembra, 8 ratones/grupo se tratan 3 días después de la inyección tumoral con los fármacos siguientes:

- 15 1. Vehículo
2. 7-t-butoxiiminometilcamptotecina 0,28 mg/10 ml/kg y 0,19 mg/10 ml/kg p.o. (cd x 5/sem, días 3-7)
3. Carboplatino 50 mg/10 ml/kg y 33,3 mg/10 ml/kg, i.p. (c4d x 2, días 3, 7)
4. Grupos de combinación: 7-t-butoxiiminometilcamptotecina + Carboplatino: 0,28+50, 0,28+33,3, 0,19+50, 0,19+33,3.
- 20 7 ratones/grupo se tratan también 3 días después de la inyección tumoral con los fármacos siguientes:
 1. 7-t-butoxiiminometilcamptotecina 0,19 mg/10 ml/kg, p.o. (cd x 5/sem x 2sem, días 3-7, 10-14).
 2. Carboplatino 50 mg/10 ml/kg i.p. (c7d x 2, días 3, 10).

En todos los grupos de combinación, el fármaco se administró 1 hora antes de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina.

- 25 Para evaluar la actividad antitumoral de los fármacos sobre xenoinjertos humanos, el volumen del tumor se evalúa midiendo los diámetros del tumor cada dos semanas con un compás Vernier. La fórmula TV (mm³) = [longitud (mm) x anchura(mm)²]/2 se usa, cuando la anchura y la longitud son los diámetros más cortos y más largos de cada tumor, respectivamente. Cuando los tumores de los ratones alcanzan un volumen de aproximadamente 2 g, se sacrifica a los animales mediante dislocación cervical.

ANÁLISIS DE DATOS

- 30 Todos los datos brutos se registran en formas adecuadas unidas en registros numerados, se almacenan y se procesan mediante un sistema informático. La fórmula VT (mm³) = [longitud (mm) x anchura (mm)²]/2 se usa, cuando la anchura y la longitud son los diámetros más cortos y más largos de cada tumor, respectivamente. El LCK (log₁₀ de muerte celular) se calcula usando la fórmula siguiente: (T-C)/3.32 x TD en la que T-C son el tiempo medio (en días) requerido para tumores tratados (T) y control (C), respectivamente, para alcanzar un volumen determinado y TD es el tiempo de duplicación de los tumores control. RC se define como la desaparición del tumor que dura al menos 10 días después del fin de los tratamientos. El efecto de la combinación de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y los diferentes agentes se evalúa de acuerdo con el procedimiento de Romanelli y col. (1998). Un índice R de 1 (efecto aditivo) o menor indica la ausencia de sinergia. La sinergia se define como cualquier valor de R mayor de la unidad. R se calcula a partir de los valores previstos y observados de T/C %.
- 35
- 40 Modelo tumoral carcinoma de ovarios resistente a platino A2780/DDP: 7-t-butoxiiminometilcamptotecina a la dosis máxima tolerada aproximada de 0,28 mg/kg (cd x 5/sem) es ligeramente eficaz (IVT = 46 %) y mostró una actividad comparable a la del carboplatino (50 mg/kg, i.p., c 4d x2) (TVI = 34 %). Cuando 7-t-butoxiiminometilcamptotecina se combina con carboplatino se encuentra una adición a la interacción sinérgica.
- 45 La actividad antitumoral de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina [A] (p.o., cd x 5/sem, +3) en combinación con carboplatino [B] (i.p., c4d x 2, +3) contra carcinoma de ovarios resistente a platino A2780/DDP

Fármaco	Dosis (mg/kg)	PPC % ¹	Tox ²	IVT% ³	LCK ⁴
A	0,19	1	0/8	35	0,18
A	0,28	7	0/8	46	0,23
B	33	4	0/8	0	0
B	50	6	0/8	34	0,26
B+A	33+0,19	8	0/8	28	0,39
B+A	50+0,19	18	0/8	40	0,39
B+A	33+0,28	10	0/8	60	0,57
B+A	50+0,28	21	0/8	62	0,80

5 El tratamiento comienza 3 días después de la inyección del tumor. ¹Pérdida de peso corporal en % inducida por tratamiento farmacológico. ²Ratones muertos/tratados. ³Inhibición del volumen tumoral en % en tumores tratados frente al control. ⁴LCK = log10 de muerte celular. TD =1,7 días. R = 0,9 (33+0,19); 0,71 (50+0,19); 1,35 (33+0,28); 0,94 (50+0,28).

10 Modelo tumoral carcinoma de ovarios A2780: La 7-t-butoxiiminometilcamptotecina a la DMT de 0,28 mg/kg muestra una potente actividad antitumoral en términos de inhibición del volumen tumoral (IVT= 100 %), RC = 8/8 y LCK >2. Cuando se combina con carboplatino a la dosis subóptima de 33,3 mg/kg, i.p., c4d x 2, se observa un incremento del LCK, lo que sugiere una persistencia mayor del efecto en la inhibición del crecimiento tumoral tras el fin del tratamiento. Un resultado similar se obtiene cuando la 7-t-butoxiiminometilcamptotecina durante 2 semanas (0,19 mg/kg, cd x 5/sem x 2sem) se combina con carboplatino (50 mg/kg, c7d x 2), ya que se alcanzó un mayor LCK.

La actividad antitumoral de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina [A] (p.o., cd x 5/sem, +3) en combinación con carboplatino [B] (i.p., c4d x 2, +3) contra carcinoma de ovarios A2780.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	PPC % ¹	Tox ²	IVT% ³	RC ⁴	LCK ⁵
A	0,19	6	0/8	100	8/8	2,15
A	0,28	13	0/8	100	8/8	2,44
B	33,3	4	0/8	82	2/8	1,0
B	50	5	0/8	84	1/8	1,0
B + A	33,3 + 0,19	13	0/8	100	8/8	2,87
B + A	33,3 + 0,28	25	0/8	100	8/8	4,30
B + A	50 + 0,19	19	0/8	100	8/8	3,58
B + A	50 + 0,28	27	2/8	100	6/6	5,90

15 El tratamiento comienza 3 días después de la inyección del tumor. ¹Pérdida de peso corporal en % inducida por tratamiento farmacológico. ²Ratones muertos/tratados. ³Inhibición del volumen tumoral en % en tumores tratados frente al control. ⁴RC = respuesta completa tras el último tratamiento. ⁵LCK = log10 de muerte celular. TD =2,1 días. El día +60, los ratones siguientes carecían de lesiones tumorales: 33,3+0,19 (1/8), 50+0,19 (2/8), 33,3+0,28(5/8), 50+0,28 (3/6).

20 La actividad antitumoral de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina [A] (p.o., cd x 5/semx2sem, +3) en combinación con carboplatino [B] (i.p., c7d x 2, +3) contra carcinoma de ovarios A2780.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	PPC % ¹	Tox ²	IVT % ³	RC ⁴	LCK ⁵
A	0,19	6	0/7	100	4/7	3,15
B	50	5	0/7	71	1/7	1,15
B + A	50 + 0,19	18	0/7	100	7/7	5,30

25 El tratamiento comienza 3 días después de la inyección del tumor. ¹Pérdida de peso corporal en % inducida por tratamiento farmacológico. ²Ratones muertos/tratados. ³Inhibición del volumen tumoral en % en tumores tratados frente al control. ⁴RC = respuesta completa tras el último tratamiento. ⁴LCK = log10 de muerte celular. TD=2,1 días. El día +60, los ratones siguientes carecen de lesiones tumorales: 0,19 (4/7), 50 (1/7), 50+0,19 (7/7).

30 El modelo tumoral de CPCNP NCI-H460 NSCLC, 7-t-butoxiiminometilcamptotecina (0,28 mg/kg, p.o., cd x 5) revela un fuerte efecto antitumoral (IVT = 94 %) en comparación con carboplatino a 50 mg/kg, i.p. c4d x 2, (DMT), con un efecto antitumoral moderado (ITV= 59 %). Cuando la 7-t-butoxiiminometilcamptotecina (0,28 mg/kg) se combina con

una dosis subóptima de carboplatino (33,3 mg/kg), se observa un efecto sinérgico (R =3), tal que se alcanza una TVI del 100 % y 3 de 8 ratones carecen de lesión tumoral 10 días después de la implantación del tumor. Con este tipo de combinación se encuentra una ventaja terapéutica, ya que supera la eficacia de los dos fármacos administrados por separado. Con la combinación de otras dosis se encuentra un efecto aditivo. La 7-t-butoxiiminometilcamptotecina también se administra de acuerdo con el programa cdx5/seemx2sem a 0,19 mg/kg en combinación con carboplatino a 50 mg/kg, i.p., c7d x 2 siguen produciendo un efecto sinérgico (R =1,9)

La actividad antitumoral de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina [A] (p.o., cd x 5/sem, +3) en combinación con carboplatino [B] (i.p., c4d x 2, +3) contra carcinoma de pulmón de células no pequeñas NCI-H460.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	PPC % ¹	Tox ²	IVT% ³	RC ⁴	LCK ⁵
A	0,19	8	0/8	79	1/8	1,14
A	0,28	16	1/8	94	0/8	1,45
B	33,3	4	0/8	49	0/8	0,73
B	50	8	0/8	59	0/8	0,83
B + A	33,3 + 0,19	12	0/8	91	0/8	1,87
B + A	50 + 0,19	21	0/8	95	0/8	1,87
B + A	33,3 + 0,28	26	0/8	100	3/8	2,6
B + A	50 + 0,28	25	0/8	97	1/8	2,1

El tratamiento comienza 3 días después de la inyección del tumor. ¹Pérdida de peso corporal en % inducida por tratamiento farmacológico. ²Ratones muertos/tratados. ³Inhibición del volumen tumoral en % en tumores tratados frente al control. ⁴RC = respuesta completa tras el último tratamiento. ⁵LCK = log10 de muerte celular. TD =2,9 días. R = 1,2 (33,3+0,19); 1,7 (50+0,19); 3 (33,3+0,28); 0,82 (50+0,28).

La actividad antitumoral de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina [A] (p.o., cd x 5/sem x 2sem, +3) en combinación con carboplatino [B] (i.p., c7d x 2, +3) contra carcinoma de pulmón de células no pequeñas NCI-H460.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	PPC % ¹	Tox ²	IVT% ³	RC ⁴	LCK ⁵
A	0,19	7	0/7	94	0/7	2,3
B	50	3	0/7	38	0/7	0,73
B + A	50 + 0,19	18	0/7	98	0/7	2,9

El tratamiento comienza 3 días después de la inyección del tumor. ¹Pérdida de peso corporal en % inducida por tratamiento farmacológico. ²Ratones muertos/tratados. ³Inhibición del volumen tumoral en % en tumores tratados frente al control. ⁴RC = respuesta completa tras el último tratamiento. ⁵LCK = log10 de muerte celular. TD =2,9 días. R = 1,86 (50+0,19).

Ejemplo 2: combinación de -t-butoxiiminometilcamptotecina y cis-platino

Procedimientos experimentales in vitro

25 Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad

El carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) NCI-H460 se obtiene de la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC) A549 (NSCLC), el adenocarcinoma de colon HT-29, los carcinomas ováricos A2780 y A2780/Dx, A2780/DDP proceden del Istituto Nazionale Tumori, Milán, Italia. Las células se cultivan en medio RPMI 1640 (GIBCO) que contiene 10% de suero bovino fetal (GIBCO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (SIGMA). Con el fin de analizar los efectos de los agentes quimioterapéuticos sobre el crecimiento celular, las células se siembran en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Corning) a una confluencia de aproximadamente 11 10 % y se deja que se fijen y se recuperan durante al menos 24 horas. Después, a cada pocillo se añaden concentraciones variables de fármacos solos o combinados. Las placas se incuban durante 2 horas y después se lavan antes de incubar sin fármacos durante 72 horas adicionales. Otras placas se tratan con fármacos secuencialmente (2 h con un fármaco, seguido de otro fármaco durante 72 horas). El número de células supervivientes se determina mediante tinción con sulforodamina B (SRB) como han descrito Skehan Pest y col. (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107-1112.

ANÁLISIS DE DATOS

La interacción entre -t-butoxiiminometilcamptotecina y los diferentes fármacos se determina usando el análisis de Drewinko y col. (1976) Cancer Biochem. Biophys. 1:187-195. El análisis se realiza del siguiente modo: (SFaxSFb/SFa+SFb)/100, donde SFa es la fracción de supervivencia de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y SFb es

la fracción de supervivencia del agente quimioterapéutico. Los valores indicaron los efectos siguientes: Un valor > 1 sinergia, <1 antagonismo, =1 aditivo.

Carcinoma de pulmón de células no pequeñas NCI-H460: Cuando las células se exponen de forma simultánea o secuencial, la combinación muestra un efecto citotóxico aditivo (índice R de 1).

5 Carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549: Cuando las células se exponen de forma simultánea a 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y cis-platino o al tratamiento secuencial de cis-platino seguido de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina muestran un efecto citotóxico aditivo (índice R de 1). Cuando las células A549 se exponen de forma secuencial a 7-t-butoxiiminometilcamptotecina seguido de cis-platino, se observa un efecto citotóxico sinérgico (valores R de 1,2-1,3).

10 Carcinoma de ovarios A2780: Cuando las células se expusieron de forma simultánea o secuencial, la combinación muestra un efecto citotóxico aditivo (índice R de 1).

Carcinoma de ovarios (resistente a platino) A2780/DDP: cuando las células se exponen de forma simultánea o secuencial a cis-platino, seguido de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina, la combinación muestra un efecto citotóxico aditivo (índice R de 1). Cuando las células a2780/DDP se exponen de forma secuencial a 7-t-butoxiiminometilcamptotecina seguido de cis-platino, se observa un efecto citotóxico sinérgico (valores R de 1,2).

15

Programas:

(A) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina + cis-Platino

(B) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina primero, después cis-Platino

(C) cis-platino primero, después 7-t-butoxiiminometilcamptotecina

Línea celular	Valor medio de R	Programa	Comentarios	
H460 CPCNP	1	ABC		
A549 CPCNP	1	AC		
A549 CPCNP	7,2 - 1,3	B		
A2780 ovarios	1	ABC		
A2780DDP ovarios	1	AC	Línea celular resistente a Pt	
A2780DDP ovarios	1,2	B	Línea celular resistente a Pt	

20

Ejemplo 3. Combinación de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y epotilona B

Procedimientos experimentales in vitro

Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad

25 Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas humana A549 (CCL 185) y de carcinoma de ovarios SK-OV-3 (ATCC HTB 77) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.). El carcinoma de próstata metastásico humano PC-3M se obtiene del Dr. I. J. Fidler (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, EE.UU.). Los medios de cultivo celular y los suplementos proceden de Animed/Bioconcept (Allschwil, Suiza).

30 Las células se cultivan con medio RPMI-1640 (suplementado con 10 % de FCS, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM)) a 37 °C en un incubador con 5% de CO₂ v/v y 80 % de humedad relativa. La inhibición de la proliferación celular en monocapa por los compuestos de ensayo se evalúa mediante tinción con azul de metileno. Las células se siembran el día 0 a 1,5 x 10³ células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incuban durante la noche. Las interacciones farmacológicas de epotilona B y la pareja de combinación se evalúan en condiciones de adición del fármaco simultánea así como secuencial, del siguiente modo.

35 Adición simultánea del fármaco: La epotilona B y la pareja de combinación se añaden de forma concomitante el día 1 y los efectos antiproliferativos se evalúan tras incubación durante 72 horas el día 4. Adición secuencial del fármaco, a) "Epotilona B antes de la pareja de combinación": La epotilona B se añade el día 1. Tras incubación durante 24 horas, el medio que contiene fármaco se retira mediante aspiración el día 2 y se sustituye con medio que contiene la pareja de combinación. Tras la incubación adicional durante 48 horas, los efectos antiproliferativos se evalúan el día 4. Adición secuencial del fármaco, b) "Epotilona B tras la pareja de combinación". La pareja de combinación se añade el día 1. Tras incubación durante 24 horas, el medio que contiene fármaco se retira mediante aspiración el día

40

2 y se sustituye con medio que contiene Epotilona B. Tras una incubación adicional de 48 horas, los efectos antiproliferativos se evalúan el día 4. La epotilona B y la pareja de combinación se analizan en proporciones fijas (múltiples y fracciones) de sus respectivas CI_{50} de agente único en un programa dado, determinado en los experimentos piloto. Los fármacos se mezclan previamente a las concentraciones más altas previstas, seguido de nueve diluciones en serie por 1,5 en placas de pocillo hondo. Cuando se evalúan las actividades del agente único, que se realiza en paralelo a la referencia interna en cada experimento, la pareja de combinación se sustituye por su vehículo correspondiente. Cada condición se presenta por duplicado. Al final del periodo de incubación, las células se fijan con 3,3 % v/v de glutaraldehído, se lavan con agua y se tiñen con 0,05 % p/v de azul de metileno. Después de lavar, se eluye el pigmento con 3% de HCl y la densidad óptica se mide a 665 nm con un espectrofotómetro SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Análisis del índice de la combinación de los efectos de la interacción farmacológica

Para determinar la naturaleza de la interacción del fármaco (sinergia, adición y antagonismo) con respecto a la inhibición del crecimiento celular in vitro, se usa el procedimiento del índice de combinación basado en la mediana de la dosis del principio del efecto (Chou TC y Talalay P Advanced Enzyme Regulation 1977;22:27-55). Este procedimiento tiene en cuenta la potencia de cada fármaco solo y cada combinación de fármacos, así como la forma de las curvas dosis-efecto. El análisis matemático (Chou TC, Motzer RJ, Tong Y y Bosl GJ Journal of the National Cancer Institute 1994; 86:1517-1524.) se realiza usando un software comercial (Calcsyn, Biosoft, Reino Unido). El índice de combinación (IC) se calcula sobre la base de la siguiente ecuación del efecto de múltiples fármacos. $CI = (D)_1 / [(D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2]$. $(D_x)_1$ y $(D_x)_2$ son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 en combinación que producen una inhibición x % del crecimiento celular. $(D_x)_1$ y $(D_x)_2$ son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 solos, respectivamente, que producen una inhibición x % del crecimiento celular. Los IC < 1 indican más que efectos aditivos (sinergia; cuanto menor es el valor, mayor es el grado de sinergia), los IC igual a 1 indican adición y los IC > 1 indican antagonismo. Los resultados de los IC se presentan como la media +/- error estándar de la media (n= 3 experimentos independientes).

En adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas A549 (CCL 185), carcinoma de ovarios SK-OV-3 y carcinoma de próstata metastásico PC-3M, la combinación de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y epotilona B muestra un efecto citotóxico dependiente de la secuencia en el cultivo celular. La adición simultánea tiene como resultado antagonismos, mientras que los programas dan un efecto citotóxico aditivo o sinérgico.

Índice de combinación antiproliferativo de -t-butoxiiminometilcamptotecina y epotilona B administrados de forma concomitante o secuencial a células de carcinoma A549 (pulmón), PC-3M (próstata) y SK-OV-3 (ovarios) in vitro.

Programas:

- (A) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina + Epotilona B
- (B) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina primero, después Epotilona B
- (C) Epotilona B primero, después 7-t-butoxiiminometilcamptotecina

Línea celular	Fracción afectada (muerte celular)	Índice de combinación (Media ± SEM; n =3)		
		Programa A	Programa B	Programa C
A549	50 %	1,26 ± 0,12	0,89 ± 0,05	0,84 ± 0,09
	75 %	1,58 ± 0,18	0,94 ± 0,03	0,73 ± 0,04
	90 %	2,20 ± 0,74	1,07 ± 0,04	1,02 ± 0,22
PC-3M	50 %	1,48 ± 0,01	na ^a	0,57 ± 0,03
	75 %	1,80 ± 0,05	na ^a	0,86 ± 0,05
	90 %	2,37 ± 0,20	na ^a	1,37 ± 0,21
SK-OV-3	50 %	1,48 ± 0,03	1,35 ± 0,30	0,92 ± 0,08
	75 %	1,22 ± 0,09	0,98 ± 0,05	0,70 ± 0,11
	90 %	1,09 ± 0,18	1,10 ± 0,13	0,93 ± 0,11

Muerte celular (fracción afectada, correspondiente a CI_{50} , CI_{75} y CI_{90}). Los valores del índice de combinación (IC) calculado se presentan como la media +/- error estándar de la media (n= 3 experimentos independientes). Según la definición, un IC= 1 indica adición. IC < 1,0 indica sinergia (cuanto menor es el valor, más fuerte es el grado de sinergia),

mientras que un $IC > 1,0$ indica antagonismo (cuanto mayor es el valor, más fuerte es el grado de antagonismo). ^ano aplicable, es decir debido al estrecho intervalo de efectos celulares con el intervalo de fármaco analizado (menos del 50% de la fracción afectada), los valores de IC calculados muestran un intervalo de error erróneamente grande y, por tanto, no se muestran.

Ejemplo 4: combinación de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y everolimus

Procedimientos experimentales in vitro

Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad

5 Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas humana A549, de melanoma A375, de adenocarcinoma de células renales 786-O, adenocarcinoma de ovarios SK-OV-3, de carcinoma epiteloide de páncreas PANC-1, de mieloma U266B1, de adenocarcinoma colorrectal SW260, de carcinoma cervical HeLa y de carcinoma de páncreas MIA PaCa-2 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular de elección se diluye en medios adecuados basados en un recuento celular de 1.000 – 2.000 células por pocillo para las líneas celulares adherentes y de 10.000-20.000 células por pocillo para las líneas celulares en suspensión, las células se siembran en placas de 96 pocillos usando 100 µl de las células diluidas por pocillo. 4. Las células se cultivan durante la noche en un incubador a 37 ° C, 5% de CO₂ y 85 % de humedad antes del tratamiento farmacológico. Las diluciones del compuesto se realizan a partir de soluciones de DMSO para cada compuesto. Normalmente, éstas se centran en la CE₅₀ y podían ser 6 o 9 diluciones que cubrían la respuesta a la dosis completa de la célula cuando se expone al compuesto. Había una tercera serie de diluciones preparadas para la combinación de los dos compuestos. Para cada punto de dilución en esta serie se usa una proporción fija de cada compuesto. Las células se exponen simultáneamente a los compuestos durante 72 horas y, después, la cantidad de proliferación se mide con fluorescencia de azul Alamar (ant. 535 em 590) para cada pocillo usando un lector de microplacas Envision (PerkinElmer).

20 **ANÁLISIS DE DATOS**

La interacción entre 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y los diferentes fármacos se determina a partir del porcentaje de inhibición de la proliferación definida como la proporción de la determinación de punto final en cada pocillo dividida por los pocillos control. El índice de combinación (IC) se determina para los niveles de efecto de 25, 50 and 75 %, tal como describen Chou y Talay (Chou T-C, Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regulation 1984;22:27-55). Un $IC < 1$ indica un efecto citotóxico sinérgico, un $IC = 1$ indica efecto citotóxico de adición y un $IC > 1$ indica un efecto citotóxico antagonista.

- 30 Carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549: la combinación con everolimus muestra un efecto citotóxico sinérgico, como indican los valores de $IC < 1$.
- Adenocarcinoma de ovarios SKOV3: la combinación con everolimus muestra un espectro de actividad desde sinergia a aditivo en función de la concentración de fármaco usada.
- Carcinoma epiteloide de páncreas PANC-1: la combinación con everolimus muestra un espectro de actividad desde sinergia a aditivo en función de la concentración de fármaco usada.
- Adenocarcinoma colorrectal SW620: la combinación con everolimus muestra un espectro de actividad desde sinergia a aditivo en función de la concentración de fármaco usada.

7-t-butoxiiminometilcamptotecina en combinación con everolimus			
Línea celular tumoral	Índice de combinación en la fracción celular afectada (muerte celular)		
	25%	50%	75%
A549	0,51	0,14	0,5
SKOV3	1,03	0,61	0,59
PANC-1	0,84	0,89	0,95
SW620	0,87	0,91	0,98

Ejemplo 5: combinación de 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina**Procedimientos experimentales in vitro****Cultivo celular y ensayo de citotoxicidad**

5 Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas humana A549, de melanoma A375, de adenocarcinoma de células renales 786-O, adenocarcinoma de ovarios SK-OV-3, de carcinoma epiteloides de páncreas PANC-1, de mieloma U266B1, de adenocarcinoma colorrectal SW260, de carcinoma cervical HeLa y de carcinoma de páncreas MIA PaCa-2 se obtienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular de elección se diluye en medios adecuados basados en un recuento celular de 1.000 – 2.000 células por pocillo para las líneas celulares adherentes y de 10.000-20.000 células por pocillo para las líneas celulares en suspensión, las células se siembran en placas de 96 pocillos usando 100 µl de las células diluidas por pocillo. 4. Las células se cultivan durante la noche en un incubador a 37 ° C, 5% de CO₂ y 85 % de humedad antes del tratamiento farmacológico. Las diluciones del compuesto se realizan a partir de soluciones de DMSO para cada compuesto. Normalmente, éstas se centran en la CE₅₀ y podían ser 6 o 9 diluciones que cubrían la respuesta a la dosis completa de la célula cuando se expone al compuesto. Había una tercera serie de diluciones preparadas para la combinación de los dos compuestos. Para cada punto de dilución en esta serie se usa una proporción fija de cada compuesto. Las células se exponen simultáneamente a los compuestos durante 72 horas y, después, la cantidad de proliferación se mide con fluorescencia de azul Alamar (ant. 535 em 590) para cada pocillo usando un lector de microplacas Envision PerkinElmer).

20 ANÁLISIS DE DATOS

La interacción entre 7-t-butoxiiminometilcamptotecina y los diferentes fármacos se determina a partir del porcentaje de inhibición de la proliferación definida como la proporción de la determinación de punto final en cada pocillo dividida por los pocillos control. El índice de combinación (IC) se determina para los niveles de efecto de 25, 50 y 75 %, tal como describen Chou y Talay (Chou T-C, Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regulation 1984;22:27-55). Un IC < 1 indica un efecto citotóxico sinérgico, un IC= 1 indica efecto citotóxico de adición y un IC > 1 indica un efecto citotóxico antagonista.

30 Carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un efecto citotóxico sinérgico como indican los valores de IC < 1.

Adenocarcinoma de ovarios SKOV3: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un espectro de actividad desde sinérgica a antagonista en función de la concentración de fármaco usada.

35 Carcinoma epiteloides de páncreas PANC-1: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un espectro de actividad desde sinérgica a antagonista en función de la concentración de fármaco usada.

Adenocarcinoma colorrectal SW620: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un espectro de actividad desde sinérgica a antagonista en función de la concentración de fármaco usada.

40 Carcinoma de páncreas MIA PaCa-2: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un efecto citotóxico sinérgico como indican los valores de IC < 1.

Melanoma A375: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un efecto citotóxico sinérgico como indican los valores de IC < 1.

45 Carcinoma cervical HeLa: Combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina muestra un espectro de actividad desde sinérgica a aditiva en función de la concentración de fármaco usada.

ES 2 374 828 T3

7-t-butoxiiminometilcamptotecina en combinación con {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirroló[2-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina.			
Línea celular tumoral	Índice de combinación en la fracción celular afectada (muerte celular)		
	25%	50%	75%
A549	0,13	0,26	0,54
SKOV3	1,30	0,93	0,66
PANC-1	0,10	0,45	2,01
SW620	1,58	0,91	0,65
MIA PaCa-2	0,93	0,84	0,76
A375	0,44	0,56	0,63
HeLa	1,08	0,50	0,50

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) carboplatino.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) cisplatinopara su uso secuencial.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) Epotilona B.
4. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) everolimus.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) 7-t-butoxiiminometilcamptotecina; y
 - (b) {6-[4-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-fenil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il]-((R)-1-fenil-etil)-amina.