

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 718**

51 Int. Cl.:

A61K 31/685 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2007 E 07822466 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2117555**

54 Título: **Uso de compuestos de glicerol tri-sustituídos para el tratamiento de neoplasias malignas**

30 Prioridad:

20.12.2006 US 875963 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.02.2013

73 Titular/es:

**ALPHAPTOSE GMBH (100.0%)
Alsterchaussee 13
20149 Hamburg, DE**

72 Inventor/es:

**ZANDER, AXEL ROLF;
AYUKETANG, FRANCIS AYUK;
RICHTER, WOLFGANG y
WEBER, LUTZ**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 396 718 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

Uso de compuestos de glicerol tri-sustituídos para el tratamiento de neoplasias malignas.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de glicerol tri-sustituído en combinación con al menos un otro medicamento que comprende uno o más ingrediente/s activo/s adicional/es que es/son seleccionados del grupo que consiste en antimetabolitos, alcaloides de plantas, inhibidores de la topoisomerasa II e inhibidores del proteosoma para su uso en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas. La invención también se refiere a un kit de partes que comprende la combinación de tales medicamentos. Finalmente, la invención se refiere también al método correspondiente para el tratamiento de tales condiciones así como a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad de tales células malignas a medicamentos como se definen en la invención.

Las neoplasias malignas hematológicas tales como la leucemia y el linfoma son los tipos de cáncer que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Las traslocaciones cromosómicas influyen fuertemente en la etiología de estas enfermedades, mientras que esto es poco común en los tumores sólidos. Esto conduce a un enfoque diferente en el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas (véase, por ejemplo, Dewald, G.W. et al (1995) *Semin Oncol* **22**, 341-354; Grimwade, D. et al (1998) *Blood* **92**, 2322-2333; Jaffe, E.S. et al (2001) *Tumors of hematopoietic and lymphoid tissue*. Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, IARC Press, Lyon, Francia; Grimwade, D. et al (2004) *Ann Hematol.* **83**, Suppl. 1, S45-S48).

Muchos pacientes con neoplasias malignas hematológicas difundidas son tratados con quimioterapia (opcionalmente en combinación con irradiación) en algún momento durante la enfermedad. Mientras que las tasas de respuesta son generalmente altas en algunas neoplasias malignas, tales como las neoplasias linfoides, sólo un subconjunto de pacientes se curarán. Incluso entre las neoplasias linfoides algunas (por ejemplo, la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma folicular de células pequeñas hendidas en estadio III/IV, linfoma de zona marginal en estadio III/IV, linfoma de células del manto en estadio III/IV, y mieloma múltiple) son actualmente incurables con dosis estándar de quimioterapia.

Sin embargo, las opciones terapéuticas no quirúrgicas disponibles en la actualidad están asociadas con reacciones adversas a fármacos, algunas de las cuales son graves, lo que representa un factor limitante especialmente para los enfoques quimioterapéuticos, para una población cada vez más envejecida con múltiples patologías.

Uno de los problemas que hay que abordar en el tratamiento de dichas neoplasias malignas es que la recurrencia de estos tumores es inevitable incluso con, o a pesar, del uso de un régimen terapéutico agresivo. Terapia a largo plazo con agentes quimioterapéuticos no es posible debido a la toxicidad de estas sustancias, y el uso repetido no vale la pena ya que las tasas de respuesta entonces se acercan a cero. El límite de exposición a la radiación se alcanza igualmente de forma relativamente rápida, en caso de que se intente tratar incluso el tumor primario eficazmente. Por lo tanto, la situación todavía es tal que después de la finalización del primer régimen terapéutico es necesario "esperar" hasta que se haya renovado la ocurrencia.

Actualmente, las quimioterapias para el tratamiento de neoplasias hematológicas implican la administración de uno o más agentes antineoplásicos (es decir, agentes citostáticos y/o quimioterapéuticos citotóxicos), tales como agentes alquilantes, alcaloides de plantas, antimetabolitos, antibióticos, inhibidores de las topoisomerasas I y/o II, inhibidores de las tirosina quinasas, inhibidores del proteosoma, y esteroides (véase, por ejemplo, Alexanian, R. et al. (1969) *JAMA* **208**, 1680-1685; Rai, K.R. et al. (1981) *Blood* **58**, 1203-1212; Alexanian, R. et al. (1990) *Am. J. Hematol.* **33**, 86-89; Bassan, R. et al, 1992, *Leukemia* **6** (suppl. 2), 186-190; Keating, M.J. (1993) *Chemotherapy of chronic lymphocytic leukemia*, en: Cheson, B.D. (Ed.) *Chronic lymphocytic leukemia. Scientific Advances and Clinical Developments*. Marcel Dekker, Nueva York, NY, p. 297 y ss.; Boulard, F. et al. (1993) *Cancer Invest.* **11**, 534-553; Smith, M. et al. (1996) *J. Clin. Oncol.* **14**, 18-24; Noordijk E. et al. (1997) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **39**, 173; Miller, T.P. et al. (1998) *N. Eng. J. Med.* **339**, 21-26; Drucker, B. J. (2001) *N. Engl. J. Med.* **344**, 1031-1037; Richardson, P.G. et al. (2002) *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 11a). Todos los agentes antineoplásicos comunes tienen que ser administrados sistémicamente, ya que representan moléculas que también ejercen efectos no selectivos en sus objetivos fisiológicos. Sin embargo, esto implica que tales agentes anti-neoplásicos (citostáticos), especialmente si se aplican durante un largo período de tiempo, tendrán un efecto perjudicial sobre las células normales del cuerpo, es decir, su uso está asociado con efectos secundarios adversos significativos que afectan principalmente a las células del cuerpo que se dividen rápidamente. Efectos secundarios comunes incluyen, entre otros, el daño genético, náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, pérdida de cabello, supresión inmune, mielosupresión, anemia, hemorragia, citotoxicidad, neoplasmas secundarios, y similares.

Por lo tanto, todavía hay una necesidad ya sea de agentes quimioterapéuticos alternativos que muestren menos efectos secundarios adversos preservando al mismo tiempo su eficacia farmacológica o de cualquier compuesto que se administre en combinación con los anteriores agentes antineoplásicos, en los que los resultados de la adyunción produzcan un efecto citostático sinérgico y/o citotóxico sinérgico sobre las células malignas en comparación con la aplicación individual. Adyunciones tales permitirían la administración de una dosis reducida de agentes

antineoplásicos para conseguir la misma eficacia terapéutica lo que resultaría en efectos secundarios adversos menos graves.

Los compuestos de glicerol tri-sustituídos que pertenecen a la clase de alquil-lisofosfolípidos sintéticos ligados por un resto éter podrían ser compuestos candidatos para dicho enfoque combinatorio.

5 Se sabe que tales alquil-lisofosfolípidos sintéticos ligados por un resto éter tienen actividad anticancerogénica (revisado, por ejemplo, por Arthur, G., y Bittman, R. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1390**, 85-102; Jendrossek, V., y Handrick, R. (2003) *Curr. Med. Chem Anti-Canc. Agents*; **3**, 343-353; Mollinedo, F. et al. (2004) *Curr. Med. Chem.* **11**, 3163-3184). Se considera que el 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (también referido como ET-18-OCH₃, AP-121 o edelfosina) es el prototipo de estos lípidos. El 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina
10 representa un análogo sintético del factor activador de plaquetas (PAF; 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina), un fosfolípido potente activador y mediador de muchas funciones de los leucocitos, incluyendo la agregación de plaquetas, inflamación, y anafilaxia. Al contrario que la mayor parte de los fármacos quimioterapéuticos más convencionales, estos éter-lípidos sintéticos no atacan directamente al ADN celular sino que más bien afectan a la composición lípida de la membrana plasmática y/o interfieren con varias vías de transducción de señales. Por lo
15 tanto, su modo de acción no depende de la presencia de determinados receptores celulares o es dependiente del ciclo de la célula.

La quimioterapia del cáncer en general tiene por objeto reducir el crecimiento de, o destruir, las células cancerígenas, evitando daños colaterales a las células y tejidos circundantes. Por consiguiente, los agentes anticancerígenos más eficaces son aquellos que son capaces de atacar selectivamente las células cancerosas
20 diana dejando a las células normales relativamente poco afectadas. Se ha demostrado que los éter-lípidos sintéticos ejercen este tipo de efecto (véase, por ejemplo, Magistrelli, A. et al. (1995) *Drug. Metab. Dispos.* **23**, 113-118). Se han propuesto varios mecanismos de acción para explicar la toxicidad de los éter-lípidos hacia las células cancerosas, incluyendo la falta de enzimas de escisión de alquilo de las células. La incapacidad resultante para hidrolizar a los éter-lípidos conduce a su acumulación intracelular y el consiguiente daño a la organización de los
25 lípidos de la membrana celular. Otros posibles mecanismos de acción de los éter-lípidos incluyen los efectos sobre los niveles de fosforilación de las proteína intracelulares, y la alteración del metabolismo de los lípidos celulares. Las células normales suelen poseer los medios necesarios para evitar o superar los efectos potencialmente tóxicos de los éter-lípidos, mientras que las células cancerosas no los tienen.

Hasta ahora, se han usado éter-lípidos sintéticos para el tratamiento de diferentes tipos de tumores sólidos tales como tumores cerebrales o carcinomas de mama (véase, por ejemplo, el documento de patente alemana DE 2619686, así como las solicitudes de patente internacional WO 99/59599 y WO 00/01392, respectivamente). El documento de patente inglés GB 1 583 661 describe el uso de compuestos sintéticos de lisolecitina para aumentar la resistencia a enfermedades y tumores. El documento de patente de Estados Unidos 6 180 137 describe el uso de éter-lípidos en el tratamiento de cánceres y trastornos inflamatorios. El documento de patente internacional WO
30 97/04765 describe el uso de inhibidores de la transacilasa independiente del Co A para la inhibición o reducción de la proliferación celular. El documento de patente internacional WO 01/74333 describe el uso de estereoisómeros L o D de un éter-lípido (como agentes anti-cáncer o anti-inflamatorios). Gajate, C. et al. (2001) *Blood* **98**, 3860-3863 muestra que el éter-lípido ET-18-OCH₃ induce la apoptosis. Sin embargo, aunque la actividad antitumoral de estos éter-lípidos sintéticos se ha comprobado a nivel experimental en varios modelos tumorales animales, su uso clínico a
40 menudo se ve obstaculizado por efectos citotóxicos sistémicos que incluyen la hemólisis, en particular en el tracto gastrointestinal aunque también, entre otros órganos, en el pulmón, hígado o riñón.

Actualmente, en la gran mayoría de los ensayos clínicos sobre éter-lípidos sintéticos los compuestos se administran a los pacientes por vía oral o mediante el uso de la vía intravenosa. En este contexto, se encontró que la administración intravenosa de una formulación con liposomas y una emulsión lipófila de aceite en agua,
45 respectivamente, es ventajosa en comparación con el compuesto libre con el fin de mejorar la eficacia terapéutica mientras que se reduce la toxicidad no específica *in vivo* (véase, por ejemplo, Ahmad, I. et al. (1997) *Cancer Res.* **57**, 1915-1921, así como la solicitud de patente internacional WO 91/09590).

Sin embargo, también se sabe en la técnica que ciertos éter-fosfolípidos y sales de carbamoilo mientras que se muestran como beneficiosos a un paciente como inhibidores competitivos de PAF o del crecimiento tumoral con inyecciones únicas o repetidas, tienen efectos perjudiciales en la zona de la inyección. Estos efectos perjudiciales son evidentes como la lisis de las células rojas de la sangre, edema severo, inflamación, y necrosis del lugar de inyección. Estos efectos adversos también se denominan efectos "detergentes". En caso de que las inyecciones repetidas sean necesarias, estos efectos perjudiciales son particularmente desventajosos, ya que hacen que los sitios de administración sean inadecuados y requieren sitios frescos. Puesto que el número de sitios adecuados en
50 un paciente es limitado, sería muy deseable evitar dichos efectos perjudiciales asociados con la administración intravenosa del 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina.

Bastante recientemente, se ha demostrado que con el fin de limitar los efectos secundarios sistémicos es también posible administrar los éter-lípidos sintéticos por vía oral junto con un vehículo líquido potable. En la solicitud de patente internacional WO 99/59599, se describe que el 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina puede administrarse junto con vehículos basados en agua o leche que contienen al menos 3% (p/p) de grasa y/o proteína. Es tentador especular que una unión eficaz del 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina a las proteínas y/o otros lípidos "enmascara" el éter-lípido lo que resulta en una reducción de efectos secundarios adversos.

Sin embargo, en el 10-20% de los pacientes tratados con tales vehículos a base de agua y/o leche se han observado importantes incompatibilidades gastrointestinales (correspondiente a la toxicidad de grado III y IV de la OMS, respectivamente) que están asociadas con pérdida de apetito, náuseas y/o vómitos, diarrea, estreñimiento o similares (véase, por ejemplo, Drings, P. et al (1992) *Onkologie* **15**, 375-382).

Por lo tanto, sigue habiendo necesidad de un medicamento para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas que supere las limitaciones anteriores. En particular, hay necesidad de un medicamento, que permita una administración fácil y conveniente y proporcione la eficacia farmacéutica deseada sin efectos secundarios significativos.

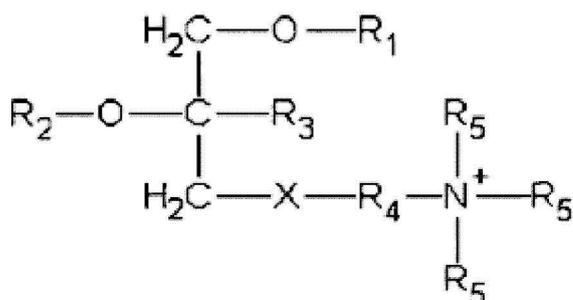
En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un medicamento para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas.

Este objeto se consigue mediante el uso de un compuesto de glicerol tri-sustituido que tiene las características de la reivindicación independiente 1 para la fabricación de un medicamento correspondiente que se puede utilizar en combinación con uno o más de otros fármacos. Algunas de las formas de realización preferidas de la presente invención se definen por la materia objeto de las reivindicaciones dependientes.

Se ha encontrado que compuestos de glicerol trisustituídos tales como el 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina no sólo son adecuados para el uso como un medicamento para el tratamiento selectivo de neoplasias malignas hematológicas, sino que también mejoran los efectos citostáticos y/o citotóxicos de varios agentes quimioterapéuticos conocidos sobre las células malignas en una forma sinérgica. Por lo tanto, estos efectos sinérgicos permiten la administración de dosis de fármacos reducidas con el fin de lograr la misma eficacia farmacéutica en comparación con una administración individual, lo que a su vez reducirá el riesgo de observar efectos secundarios sistémicos adversos.

En el contexto de la presente invención, cualquier valor numérico indicado está típicamente asociado con un intervalo de exactitud, que la persona experta en la técnica entenderá, para asegurar todavía el efecto técnico de la característica en cuestión. Como se usa en la presente memoria, la desviación del valor numérico indicado está en el intervalo de $\pm 10\%$, y preferiblemente de $\pm 5\%$.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de glicerol tri-sustituido según la fórmula (I) o un enantiómero, diastereómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas,



en donde

X se selecciona del grupo que consiste en fosfato y sulfato;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₆-C₂₀;

R₂ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃ e hidroxialquilo C₁-C₃;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₃;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃ y cicloalquilo C₃-C₆;

5 R₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y metilo, y en donde el medicamento es una forma farmacéutica de dosificación sólida para administración oral y se usa en combinación con al menos un otro medicamento que comprende uno o más ingrediente/s activo/s adicional/es que es/son seleccionados entre el grupo constituido por antimetabolitos, alcaloides de plantas, inhibidores de la topoisomerasa II e inhibidores del proteosoma.

10 El compuesto de glicerol tri-sustituido se puede usar en una forma amorfa o cristalina. El término "amorfo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un sólido en el que no hay ningún orden de largo alcance en las posiciones de los átomos, es decir, se trata de un material no cristalino. En realizaciones preferidas, el compuesto de glicerol tri-sustituido está presente en forma cristalina.

Los términos "alquilo C_n", "hidroxialquilo C_n" y "cicloalquilo C_n", como se usan en este documento, denotan un grupo alquilo, un grupo hidroxialquilo o un grupo cicloalquilo que tiene n átomos de carbono, respectivamente. Por ejemplo, el término "alquilo C₁₈" se refiere a un grupo alquilo que tiene 18 átomos de carbono. Los grupos alquilo o grupos hidroxialquilo según la invención puede ser lineales o ramificados.

15 Los compuestos de glicerol tri-sustituidos de fórmula (I) tienen uno o más centros asimétricos y por tanto pueden existir como enantiómeros o diastereómeros. En consecuencia, el medicamento utilizado en la presente invención puede comprender o bien uno o más isómeros aislados individuales (tales como la forma L y la forma D) o mezclas de isómeros, preferiblemente mezclas racémicas.

20 Los compuestos de glicerol tri-sustituidos de fórmula (I) pueden estar comprendidos en el medicamento en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales pueden comprender cualquier anión farmacéuticamente aceptable "que neutraliza" la carga positiva del nitrógeno (por ejemplo, cloruro, bromuro o yoduro) o cualquier catión farmacéuticamente aceptable "que neutraliza" la carga negativa del resto de fosfato o sulfato (por ejemplo, cationes de sodio o potasio).

25 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el medicamento comprende un compuesto de glicerol tri-sustituido según la fórmula (I), en donde X es fosfato, R₁ es -(CH₂)₁₇-CH₃, R₂ es CH₃, R₃ es H, R₄ es -(CH₂)₂, y R₅ es CH₃.

El medicamento puede estar como cualquier forma de dosificación farmacéutica que sea terapéuticamente eficaz. Ejemplos de dichas formas de dosificación farmacéutica incluyen, entre otras, comprimidos, píldoras, cápsulas, suspensiones, emulsiones, soluciones para inyección o infusión, tinturas, polvos y similares.

30 El medicamento comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El término "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, puede ser cualquier sustancia que se utilice para la preparación de formas de dosificación farmacéuticas tales como materiales de revestimiento, materiales formadores de película, rellenos, agentes desintegrantes, materiales modificadores de la liberación, materiales portadores, diluyentes, agentes aglutinantes y otros adyuvantes, todos ellos bien conocidos en la técnica (véase las referencias citadas a continuación). Preferiblemente, el excipiente comprende al menos un relleno, al menos un agente aglutinante, al menos un agente de desintegración, por lo menos un agente controlador de la fluidez, y al menos un lubricante.

40 El medicamento puede ser administrado por cualquier vía parenteral o no parenteral. Los métodos de aplicación parenteral comprenden, por ejemplo, inyección intracutánea, subcutánea, intramuscular o intravenosa, y las técnicas de infusión. Modos de administración no parenterales incluyen, por ejemplo, la administración oral o tópica. Además, el medicamento se puede administrar localmente o sistémicamente.

45 Preferiblemente, el medicamento es una forma de dosificación sólida, particularmente preferiblemente una formulación farmacéutica sólida adecuada para la aplicación oral. Ejemplos de tales formas de dosificación incluyen, entre otros, comprimidos, píldoras, cápsulas, granulados, pelets, polvos, formulaciones de múltiples partículas (por ejemplo, perlas, gránulos o cristales), y grageas. Las dosis unitarias de múltiples partículas se puede incorporar en una formulación farmacéutica sólida de dosificación, por ejemplo, mediante compresión o conformación en comprimidos o colocando una cantidad requerida dentro de una cápsula de gelatina.

50 Todas estas formas sólidas de dosificación para aplicación oral, así como métodos para su preparación están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gennaro, A.L. y Gennaro, A. R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; Ritschel, WA & Bauer-Brandl, A. (2002) *Die Tablette: Handbuch der Entwicklung, Herstellung und Qualitätssicherung*. Editio Cantor-Verlag, Aulendorf, Alemania; Crowder, T.M. et al. (2003) *A Guide to Pharmaceutical Particulate Science*. Interpharm / CRC, Boca Raton, FL; Stricker, H. (2003) *Arzneiformenentwicklung*, Springer Verlag, Berlín, Alemania; Niazi, S.K. (2004) *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, CRC Press, Boca Raton, FL).

En realizaciones preferidas, la forma de dosificación farmacéutica sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, píldoras, cápsulas y gránulos, los comprimidos son particularmente preferidos.

5 En otra forma de realización preferida, la forma de dosificación sólida es una forma de dosificación entérica. Es decir, la forma de dosificación se mantiene estable en el estómago, es decir, en un entorno muy ácido, con valores de pH en el intervalo de $\leq 2,5$. Esto puede lograrse al proporcionar una forma de dosificación sólida que comprende un recubrimiento de película. Por ejemplo, la forma de dosificación de la invención puede estar en la forma de lo que se conoce como un comprimido con película.

10 Los métodos para la preparación de formas de dosificación recubiertas de película están también bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gennaro, A.L. y Gennaro, A.R. (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; Ritschel, W.A. & Bauer-Brandl, A. (2002) *Die Tablette: Handbuch der Entwicklung, Herstellung und Qualitätssicherung*. Editio Cantor-Verlag, Aulendorf, Alemania; Crowder, T.M. et al. (2003) *A Guide to Pharmaceutical Particulate Science*. Interpharm / CRC, Boca Raton, FL; Niazi, S.K. (2004) *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, CRC Press, Boca Raton, FL). Además, el experto en la técnica también sabe cómo proporcionar recubrimientos de película con propiedades específicas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de película que se disuelven al contacto con fluidos corporales, recubrimientos de liberación controlada, recubrimientos de enmascaramiento del sabor o recubrimientos de desintegración. En una realización particularmente preferida, la forma de dosificación sólida de la invención comprende un recubrimiento entérico.

20 Ha de entenderse que el compuesto de glicerol tri-sustituido está presente en el medicamento en cualquier cantidad eficaz para lograr el efecto farmacológico deseado, tal como para detener la progresión de un tumor o para inducir un efecto apoptótico en células tumorales cuando se administra a un paciente. Las cantidades eficaces son generalmente elegidas según una serie de factores, por ejemplo, la edad, tamaño y estado general del paciente y la condición médica que se está tratando, y determinadas con una variedad de medios, por ejemplo, ensayos de intervalos de dosis, bien conocidos por, y fácilmente practicados por personas de habilidad ordinaria en la técnica, dada la información de esta invención.

25 Normalmente, en el medicamento la cantidad del compuesto de glicerol tri-sustituido según la fórmula (I) es inferior a 400 mg, preferiblemente está en el intervalo de 30 a 250 mg, y lo más preferible está en el intervalo de 50 a 150 mg. En realizaciones particularmente preferidas, la cantidad del compuesto de glicerol tri-sustituido según la fórmula (I) en el medicamento es 75 mg y 100 mg, respectivamente.

30 La dosis diaria del compuesto de glicerol tri-sustituido en el medicamento que se administra a un paciente es inferior a 1200 mg, típicamente menos de 900 mg, preferiblemente en el intervalo de 30 a 600 mg, más preferiblemente en el intervalo de 40 a 400 mg, y lo más preferible en el intervalo de 50 a 350 mg. En realizaciones específicas, la dosis diaria es 75, 100, 150, 200, 225, y 300 mg. Preferiblemente, la dosis diaria del compuesto de glicerol tri-sustituido se administra como una dosis única tal como en forma de uno hasta cuatro comprimidos o cápsulas. Sin embargo, también puede ser posible administrar el compuesto en dosis múltiples tales como dos o tres dosis individuales administradas durante el día, por ejemplo, en la mañana, al mediodía y por la noche.

35 El término "neoplasias malignas hematológicas" (también conocidas como "neoplasias hematológicas"), tal como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier tipo de cáncer que afecta a la sangre, la médula ósea u órganos linfáticos. Neoplasias malignas hematológicas incluyen, entre otras la leucemia, linfoma, mieloma múltiple y síndrome mielodisplásico.

40 El término "leucemia", como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier tipo de cáncer de la sangre o la médula ósea que se caracteriza por una proliferación anormal de células de la sangre, por lo general de las células blancas de la sangre (o sea, los leucocitos). Dentro del alcance de la presente invención, el término incluye cualquier forma aguda y crónica de la leucemia, así como cualquier otra forma de leucemia linfoide o leucemia mieloide. Las formas de leucemia linfoide (o linfocítica) aguda se caracterizan porque las células linfoides (es decir, los agranulocitos) tales como los linfocitos y monocitos se ven afectados, mientras que cuando las células mieloides (es decir, los granulocitos), tales como los eosinófilos, neutrófilos y basófilos están afectados, la enfermedad se conoce como leucemia mieloide (o mielógena) aguda. En realizaciones preferidas, la leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoide aguda (LLA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoide crónica (LLC).

45 El término "linfoma", como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier forma de cáncer que se origina en los linfocitos, o sea que incluye el linfoma de Hodgkin que se caracteriza por la propagación ordenada de la enfermedad desde un ganglio linfático y la presencia de células de Reed-Sternberg, así como a cualquier tipo de linfoma no Hodgkin. En realizaciones preferidas, la neoplasia maligna hematológica se selecciona entre el grupo que consiste en el linfoma de Hodgkin y el linfoma no-Hodgkin.

El término "mieloma múltiple" (también conocido como "mieloma" o "plasmacitoma"), como se usa en este documento, denota un tipo de cáncer de células plasmáticas, es decir, de las células inmunes de la médula ósea que producen los anticuerpos.

5 El término "síndrome mielodisplásico" (anteriormente conocido como "pre-leucemia"), como se usa en este documento, denota una colección diversa de trastornos hematológicos unidos por la producción ineficaz de células de la sangre y riesgos variables de transformación a leucemia mielógena aguda. La anemia que requiere transfusión de sangre crónica se presenta con frecuencia. Aunque no es una verdadera neoplasia maligna, el síndrome mielodisplásico se clasifica sin embargo con las neoplasias hematológicas.

10 El medicamento se puede utilizar para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas en combinación con al menos otro fármaco que comprende al menos un ingrediente activo adicional. Es decir, se utiliza un medicamento que comprende un compuesto de glicerol tri-sustituido junto con al menos otro fármaco que comprende uno o más ingredientes activos adicionales, es decir ingredientes activos diferentes de los compuestos de glicerol tri-sustituidos como se definen en la reivindicación 1. En realizaciones de la solicitud, el uno o más ingredientes activos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en agentes antineoplásicos y/o del grupo que consiste en anticuerpos dirigidos contra uno o más epítomos en la superficie celular de las células hematológicas (hematopoyéticas).

15 El término "agentes antineoplásicos" (en adelante también denominado como "fármacos citostáticos"), como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier fármaco que interfiera con la cariocinesis celular (es decir, mitosis) y/o citocinesis (división celular), en particular en las células malignas (es decir, células tumorales), es decir, que cause una interrupción, retraso o prohibición de dicho proceso(s). También se incluyen en este documento los fármacos citostáticos que tienen también un efecto citotóxico, es decir fármacos que causan la muerte celular al interferir con la cariocinesis y/o citocinesis.

Ejemplos de agentes antineoplásicos (citostáticos) que se pueden utilizar en la presente solicitud incluyen entre otros los agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas, antibióticos, inhibidores de topoisomerasas I y/o II, esteroides, inhibidores de las tirosina quinasas, inhibidores del proteosoma y agentes de intercalado de ADN.

25 El término "agentes alquilantes", como se usa en este documento, representa compuestos que son capaces de agregar grupos alquilo a diferentes grupos electronegativos presentes en moléculas celulares tales como ácidos nucleicos o proteínas. Típicamente, estos compuestos interfieren con el crecimiento y la progresión tumoral por medio de la reticulación de las nucleobases de guanina en las hebras de ADN. Esta modificación evita que el ADN se desenrolle y la separación de las hebras, y evita por lo tanto la replicación del ADN.

30 En realizaciones de la solicitud, los agentes alquilantes se seleccionan del grupo de las mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, derivados de platino, y sulfonatos de alquilo. Ejemplos de las mostazas de nitrógeno incluyen, entre otros, el clorambucil (LLC), ciclofosfamida (linfomas), melfalán (mieloma múltiple), y mecloretamina (linfomas de Hodgkin). Ejemplos de nitrosoureas son entre otros la carmustina (linfomas), y ejemplos de derivados del platino incluyen, entre otros, el cisplatino (linfomas) y carboplatino (linfomas, LLA). Ejemplos de sulfonatos de alquilo incluyen, entre otros, el busulfán (LMC), y treosulfan (linfomas).

El término "antimetabolito", como se usa en este documento, se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura parecida a una sustancia (un metabolito) que se requiere para reacciones bioquímicas celulares, pero que son lo suficientemente diferentes como para interferir con la función celular normal.

40 En realizaciones preferidas, los antimetabolitos se seleccionan del grupo que consiste en metotrexato, (LLA), análogos de purina, y análogos de pirimidina. Ejemplos de análogos de purina incluyen la fludarabina entre otros (linfomas no Hodgkin, LMA), clofarabina (LLA), pentostatina (LLC), y cladribina (LLC), y ejemplos de análogos de pirimidina incluyen la citarabina entre otros (leucemia, linfomas no Hodgkin), y decitabina (síndrome mielodisplásico).

45 Ejemplos de alcaloides de plantas (es decir, aminas de plantas de origen natural o producidas sintéticamente) incluyen, entre otros, la vincristina (linfoma no Hodgkin, LLA) y vinblastina (linfoma de Hodgkin). Antibióticos ejemplarizantes que se pueden utilizar en la invención incluyen, entre otros, la mitoxantrona (LMA), epirrubicina (linfomas), doxorubicina (linfoma de Hodgkin), daunorubicina (LMA, LLA), y bleomicina (linfoma de Hodgkin). Los inhibidores de la topoisomerasa interfieren con la función normal de las topoisomerasas de tipo I y/o tipo II, que son las enzimas que actúan sobre la topología del ADN. Se prefieren los inhibidores de la topoisomerasa II tales como el etopósido (linfomas, LMA, LMC) o tenipósido (LLA).

50 Otros agentes antineoplásicos incluyen entre otros el esteroide dexametasona (linfomas no Hodgkin), el inhibidor de tirosina quinasa imatinib (LMC), el inhibidor del proteosoma bortezomib (mieloma múltiple), el agente intercalador de ADN amsacrina (LLA, LMA) y la talidomida (mieloma múltiple).

El respectivo uso médico principal de los anteriores agentes antineoplásicos se indica entre paréntesis. Sin embargo, esto no excluye el uso de cualquiera de estos fármacos para el tratamiento de cualquier otra neoplasia

maligna hematológica. Además, también es posible utilizar una combinación de dos o más de estos fármacos para el tratamiento de cualquier neoplasia maligna hematológica.

En una realización concreta preferida, los agentes anti-neoplásicos se seleccionan del grupo que consiste en el clorambucil, ciclofosfamida, melfalan, mecloretamina, carmustina, cisplatino, carboplatino, busulfano, treosulfan, metotrexato, fludarabina, clofarabina, pentostatina, cladribina, citarabina, decitabina, vincristina, vinblastina, mitoxantrona, epirrubicina, doxorubicina, daunorrubicina, bleomicina, etopósido, tenipósido, dexametasona, imatinib, bortezomib, amsacrina, y talidomida.

Los anticuerpos descritos en este documento comprenden anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra uno o más epítomos en la superficie celular de las células hematológicas (hematopoyéticas). El término "células hematológicas (hematopoyéticas)", como se usa en este documento, denota cualquier célula de origen hematopoyético incluyendo las células de origen mieloide y linfático. El término "dirigido contra uno o más epítomos en la superficie celular", como se usa en este documento, se refiere al hecho de que un anticuerpo usado en la presente invención puede reconocer/enlazar una o varias moléculas de la superficie celular (es decir, epítomos) de una célula hematológica.

En realizaciones de la solicitud, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que es un anticuerpo dirigido contra un antígeno específico que se genera a partir de una población de linfocitos de células B que son todos duplicados descendientes de una célula de producción de anticuerpos original. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo quimérico (humanizado), por ejemplo, un anticuerpo quimérico murino/humano. Los métodos para la generación de tales anticuerpos monoclonales "de ingeniería" están bien establecidos en la técnica (revisada, por ejemplo, en Coligan, J.E, et al. (2002) *Current Protocols in Immunology*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ).

Ejemplos de tales anticuerpos monoclonales que pueden ser empleados incluyen, entre otros, al alemtuzumab (anti-CD52, LLC, linfomas), rituximab (anti-CD20; LLC, linfoma no Hodgkin), y gentuzumab ozogamizín (anti-CD33, LMA).

La presente solicitud se refiere al método correspondiente para la prevención y/o el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, en donde el método comprende:

(a) administrar a un paciente un medicamento o una combinación de medicamentos, tal como se define en la invención.

Como se señaló anteriormente, la combinación de medicamentos puede ser administrada por medio de cualquier vía parenteral o no parenteral. Los productos farmacéuticos individuales pueden ser administrados por medio de la misma o de diferentes vías. El medicamento que comprende el compuesto de glicerol tri-sustituido es administrado por vía oral, como una forma de dosificación sólida. Además, el medicamento se administra preferentemente en una sola dosis tal como en forma de un comprimido o cápsula al día. Sin embargo, es posible que también pueda administrarse el medicamento en dosis múltiples tales como dos o tres dosis individuales administradas durante el día. En caso de utilizarse una combinación de medicamentos (tales como en forma de un kit de partes), los fármacos individuales (es decir, el medicamento que comprende el compuesto de glicerol tri-sustituido y el al menos otro producto farmacéutico) pueden administrarse simultáneamente, por separado o de forma secuencial. Por ejemplo, es posible administrar un medicamento durante una comida y otro una o varias horas más tarde.

En una realización de la solicitud, el método comprende además:

(b) determinar el alcance de la expresión del gen del receptor Fas en una o más células malignas del paciente a tratar antes de administrar el medicamento o la combinación de medicamentos.

Como ya se ha indicado anteriormente, el receptor de muerte de la célula Fas (también conocido como APO-1 o CD95) ha sido identificado como una diana celular del 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfolina (véase, por ejemplo, Gajate, C. et al (2004) *J. Exp. Med* **200**, 353-365; Nieto-Miguel, T. et al (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 14833-14840). En el contexto de la actual invención, se ha encontrado que células malignas hematológicas (es decir, las células tumorales) que sobreexpresan el receptor Fas muestran una mayor sensibilidad hacia el tratamiento con un medicamento tal como se define en las reivindicaciones.

Los términos "expresión" o "expresión de genes", como se usan en este documento, se refieren a la totalidad de vías reguladoras que convierten la información codificada en la secuencia de ácido nucleico de un gen primero en ARN mensajero (ARNm) y luego a una proteína. En consecuencia, la expresión de un gen abarca su transcripción en un ARNhn primero, el procesamiento de este ARNhn en un ARN maduro y la traducción de la secuencia de ARNm en la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína.

Como se utiliza en este documento, el término "sobre-expresión" se refiere a un nivel de expresión de al menos el 100% del de una célula de control no maligna (no tumorigénica) (es decir, una célula de tipo silvestre). En consecuencia, en una realización de la invención, el método comprende además comparar los resultados de las

mediciones obtenidas en las células tumorales con aquellas obtenidas en una o más células de control de un sujeto sano.

El término "determinar" se refiere a cualquier método para detectar un "producto de expresión del gen". En el ámbito de la invención presente, el término "producto de expresión del gen" se refiere no sólo a la proteína codificada por ese gen, sino también al ARNm correspondiente, que puede ser considerado como el "producto génico primero" durante el curso de la expresión génica. Estos métodos comprenden procedimientos establecidos estándar bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, Hoboken, NJ). Ejemplos de tales métodos son RT-PCR, el ensayo de protección de ARNasa, Northern análisis, Western análisis, ELISA, y ensayo de radioinmunoensayo o ensayo de titulación de fluorescencia.

Por ejemplo, un ARNm puede ser detectado por hibridación con una sonda de ácido nucleico marcada (ADN o ARN) y posterior análisis ya sea mediante Northern blotting o con la realización de un ensayo de protección de ARNasa. Alternativamente, el correspondiente ADNc puede ser preparado a partir de ARN celular (ya sea ARN total o ARNm) mediante transcripción inversa y analizado en cuanto a la ausencia o presencia de una especie particular de ácidos nucleicos por amplificación por PCR (es decir, RT-PCR). Las proteínas pueden ser convenientemente detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos, que pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Para la visualización, el anticuerpo puede estar marcado o puede utilizarse un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta adecuada, que se une al anticuerpo primario específico. La detección se puede hacer, por ejemplo, en un análisis Western-blot o ELISA. Marcadores adecuados para realizar los métodos de la invención incluyen marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, digoxigenina, biotina, moléculas orgánicas pequeñas, metales, complejos metálicos, y oro coloidal.

En otra realización preferida de la solicitud, el método comprende además:

(c) determinar uno o más de lo siguiente en la una o más células malignas del paciente a ser tratado antes de administrar el medicamento o la combinación de medicamentos:

(i) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *ras*;

(ii) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *FGFR3*; e

(iii) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *PTEN*.

En una realización, el método comprende además comparar los resultados de las mediciones obtenidas en la una o más células malignas con las obtenidas en la una o más células de control, es decir, las células no tumorigénicas, de un sujeto sano.

El término "mutación del gen *ras*", como se usa en este documento, se refiere a cualquier variación genética de un miembro de la familia de genes *ras*, es decir, de los genes *H-ras*, *K-ras*, y *N-ras*, en particular de los genes *ras* humanos (véase Land, H. et al. (1983) *Science* **222**, 771-778). Las variaciones genéticas según la presente invención incluyen la adición, supresión, y sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de ADN correspondiente. Preferiblemente, dichas una o más mutaciones dan lugar a una secuencia de aminoácidos alterada de la respectiva proteína correspondiente Ras, lo que también incluye la formación de variantes de proteínas truncadas o extendidas. Estas mutaciones también pueden afectar a la función de las proteínas. Por ejemplo, pueden causar una activación (constitutiva) de la proteína Ras o puede dar lugar a una variante dominante negativa de Ras. Ejemplos de tales mutaciones de genes *ras* incluyen, entre otros, las mutaciones que afectan a los codones 12, 13, y 61 del *N-ras* humano, así como los codones 12 y 71 del *K-ras* humano (véase las referencias citadas a continuación).

En realizaciones preferidas, la una o más mutaciones de genes *ras* causan una activación de la correspondiente proteína Ras (es decir, un aumento de actividad de la proteína Ras). Particulares ejemplos preferidos de tales mutaciones de genes *ras* comprenden entre otros las mutaciones en el codón 61 del *N-ras* humano, incluyendo CAA → CGA y CAA → CAC, así como mutaciones en el codón 12 del *K-ras* humano incluyendo GGT → GCT y GGT → GAT (véase, por ejemplo, Bos, J.L. et al (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 9155-9163; Pilz, R.B. et al (1997) *Cell Growth Diff.* **8**, 53-59; Delgado, M.D. et al (2000) *Oncogene* **19**, 783-790; Chesi, M. et al (2001) *Blood* **97**, 729-736).

El término "mutación del gen *FGFR3*", como se usa en este documento, se refiere a cualquier variación genética del gen del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (*FGFR3*), en particular, del gen *FGFR3* humano (Ornitz, DM, y Itoh, N. (2001) *Genome Biol.* **2**, revisiones 3005.1-3005.12). Las variaciones genéticas según la presente invención incluyen la adición, eliminación y sustitución de uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN respectiva.

- Preferiblemente, dichas una o más mutaciones dan lugar a una secuencia de aminoácido alterada de la proteína *FGFR3* respectiva correspondiente, lo que también incluye la formación de variantes de la proteína truncada o extendida. Estas mutaciones también pueden afectar a la función de la proteína. Por ejemplo, pueden causar una activación (constitutiva) de la proteína *FGFR3* o pueden originar una variante *FGFR3* dominante negativa. Ejemplos de dichas mutaciones en el gen *FGFR3* incluyen, entre otras, las mutaciones que afectan a los codones 373, 384, y 650 del *FGFR3* humano, así como una supresión del codón de parada del *FGFR3* humano (véase las referencias citadas a continuación).
- En realizaciones preferidas, la una o más mutaciones en el gen *FGFR3* causan una activación de la proteína *FGFR3* correspondiente (es decir, un aumento de la actividad de la proteína *FGFR3*). Ejemplos particulares preferidos de tales mutaciones del gen *FGFR3* comprenden, entre otros, las mutaciones de *FGFR3* humano en el codón 373 incluyendo TAT→TGT, en el codón 650 incluyendo AAG →GAG, y una supresión del codón de parada del *FGFR3* humano (véase, por ejemplo, Chesi, M. et al (1997) *Nat Genet* **16**, 260-264; Chesi, M. et al, (2001) *Blood* **97**, 729-736).
- En realizaciones preferidas particulares, la presencia o ausencia de las una o más mutaciones en el gen *FGFR3* se determinan en la presencia concomitante de la traslocación cromosómica t(4;14). Es decir, la secuencia del gen *FGFR3* se analiza en una o más células malignas (tales como las células hematopoyéticas) que tienen dicha traslocación cromosómica.
- El término "traslocación cromosómica t(4;14)", como se usa en este documento, representa una traslocación genética cariotípicamente silenciosa, es decir, un reordenamiento cromosómico anormal causado por el intercambio de piezas entre cromosomas no homólogos, en el cromosoma humano 14, en particular denota la traslocación t(4;14)(p16;q32), lo que origina una expresión desregulada del gen del receptor de factor de crecimiento fibroblástico 3 (gen *FGFR3*) (véase, por ejemplo, Richelda, R. et al. (1997) *Blood* **90**, 4062-4070; Chesi, M. et al. (2001) *Blood* **97**, 729-736).
- La presencia de la traslocación cromosómica t(4;14) en las una o más células malignas a ser analizadas puede entre otras cosas ser determinada por análisis de Southern clásico (véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al. (1989), *supra*; Ausubel, F.M. et al. (2001), *supra*) o por técnicas de hibridación *in situ*, que son preferiblemente hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH) (para una revisión véase, por ejemplo, van der Ploeg, M. (2000) *Eur. J. Histochem* **44**, 7-42; Levisky, JM y Singer, RH (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 2833 -2838).
- El término "mutación del gen *PTEN*", como se usa en este documento, se refiere a cualquier variación genética del gen supresor de tumores *PTEN*, en particular del gen humano *PTEN* (véase, por ejemplo, Sakai, A. et al. (1998) *Blood* **92**, 3410-3415; Wu, H. et al. (2003) *Oncogene* **22**, 3113-3122). Las variaciones genéticas según la presente invención incluyen la adición, supresión, y sustitución de uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN correspondiente. Preferiblemente, dichas una o más mutaciones dan lugar a una secuencia de aminoácido alterado de la proteína *PTEN* respectiva correspondiente, lo que también incluye la formación de variantes de proteínas truncadas o extendidas. Estas mutaciones también pueden afectar a la función de las proteínas. Por ejemplo, pueden causar una activación (constitutiva) de la proteína *PTEN* o puede dar lugar a una variante *PTEN* dominante negativa.
- Ejemplos preferidos de mutaciones del gen *PTEN* que se determinan en la presente invención incluyen entre otras una supresión de los exones 2-5 del gen humano *PTEN*, una supresión de 2 pb (pares de bases) e inserción de 9 pb en el codón 234, y una inserción de 39 pb en el codón 246 de la secuencia del gen *PTEN* humano, respectivamente.
- Las respectivas mutaciones de los genes *ras*, *FGFR3*, y *PTEN* se determinan por métodos de laboratorio estándar establecidos, típicamente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de restricción y/o análisis de secuencia de ADN (véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al. (1989), *supra*; Ausubel, FM et al (2001), *supra*).
- En lugar de o además de determinar la ausencia o presencia de una o más mutaciones de los genes *ras*, *FGFR3* y/o *PTEN*, respectivamente, que afectan todos a la señalización MAPK/ERK y/o PI3K/AKT (revisado, por ejemplo, en Johnson, GL y Lapadat, R. (2002) *Science* **298**, 1911-1913; Lee, JT, y McCubrey, JA (2002) *Leukemia* **16**, 486-507; Platanias, L. C. (2003) *Blood* **101**, 4667-4679; Meier, F. et al. (2005) *Front. Biosci.* **10**, 2986-3001; Martelli, AM. et al. (2006) *Leukemia* **20**, 911-928), también puede ser posible dentro del alcance de la presente invención determinar la "condición de actividad" (es decir, la activación o no) de la vía de señalización respectiva "como tal". Por ejemplo, una activación de la vía MAPK/ERK puede ser determinada por la medición de la fosforilación de ERK-1/2 por métodos inmunquímicos bien conocidos en la técnica tales como el análisis Western, inmunoprecipitación, ELISA y, de preferencia mediante el empleo de fosforilación específica de anticuerpos anti-ERK-1/2 disponibles comercialmente por varios proveedores (para una revisión de métodos inmunológicos véase, por ejemplo, Coico, R. et al. (2006) *Current Protocols in Immunology*. Wiley & Sons, Hoboken, NJ).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad de una o más células malignas a un medicamento o una combinación de medicamentos tal como se define en la invención, el método comprende:

(a) determinar la extensión de la expresión génica del receptor Fas en las una o más células malignas.

5 En una realización preferida, el método comprende además:

(b) la determinación de uno o más de lo siguiente en una o más células malignas:

(i) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *ras*;

(ii) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *FGFR3*; y

(iii) la presencia o ausencia de mutaciones del gen *PTEN*.

10 En realizaciones preferidas, la presencia o ausencia de las una o más mutaciones del gen *FGFR3* se determina en la presencia concomitante de la translocación cromosómica t(4;14).

Opcionalmente, el método comprende además:

(c) comparar los resultados de las mediciones obtenidas en (a) y/o (b) con aquellas obtenidos en una o más células de control.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de glicerol tri-sustituido como se define en este documento para uso en el tratamiento de las neoplasias malignas hematológicas. En realizaciones preferidas, las neoplasias malignas hematológicas se seleccionan del grupo que consiste en leucemia, linfoma, mieloma múltiple y síndrome mielodisplásico.

20 La presente invención se refiere además a un kit que comprende la combinación de medicamentos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas.

Los componentes (partes) del kit (es decir, los medicamentos individuales o ingredientes activos) se pueden administrar durante un tratamiento de combinación (régimen) simultáneamente, separadamente o secuencialmente (véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al. (1989), *supra*; Ausubel, FM et al. (2001), *supra*).

25 La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, que están con el único fin de ilustrar las realizaciones específicas de esta invención, y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Los materiales utilizados en los ensayos a continuación están o bien disponibles comercialmente o se preparan fácilmente a partir de materiales disponibles comercialmente por los expertos en la técnica.

Figuras

30 Figura 1 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ (1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina) en varias líneas celulares tumorales. Fueron usadas las líneas celulares a continuación: KMS-12-BM, K562, RPMI 8226, OPM-2, NCI-H929, U266, y HL60. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos en un volumen de 200 μ l a una concentración de 1×10^5 células/ml. Después, las células se incubaron durante 20 h con 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, y 20 μ g/ml de ET-18-OCH₃ (concentraciones finales), respectivamente. La muerte celular se evaluó mediante tinción de las células con 7-amino-actinomicina D (concentración final 200 μ g/ml) y se analizaron mediante citometría de flujo como se describe (véase, por ejemplo, Schmid, I. et al. (1994) *J. Immunol. Meth.* **170**, 145-157; Ayuk, FA et al. (2005) *Exp. Hematol.* **33**, 1531-1536).

35 Figura 2 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con bortezomib (Velcade®), un inhibidor del proteosoma 26S, en células Jurkat. El cultivo celular se realizó como se describe en la figura 1. Se añadió ET-18-OCH₃ a una concentración final de 2,5 o 5,0 μ g/ml ("E2,5" y "E5", respectivamente), sin o en combinación con 5 o 10 ng/ml de bortezomib ("Vel5" y "Vel10", respectivamente), y las células se incubaron durante 20 horas. La muerte celular se evaluó como se describe en la figura 1. Los resultados se expresan como media \pm SEM (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

45 Figura 3 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con bortezomib en células HL60. Las condiciones del cultivo celular, concentraciones del compuesto, y condiciones del ensayo se describen en la figura 2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

- Figura 4 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con bortezomib en RPMI8226. Las condiciones del cultivo celular, concentraciones del compuesto, y condiciones del ensayo se describen en la figura 2. Los resultados se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes.
- 5 Figura 5 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con fludarabina, un análogo de purina, en células Jurkat. El cultivo celular se realizó como se describe en la figura 1. ET-18-OCH₃ se añadió a una concentración final de 2,5 o 5,0 $\mu\text{g/ml}$ ("E2,5" y "E5", respectivamente), sin o en combinación con fludarabina 10 o 50 μM ("Flu10" y "Flu50", respectivamente), y las células se incubaron durante 20 horas. La muerte celular se evaluó como se describió en la figura 1. Los resultados se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes.
- 10 Figura 6 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con fludarabina en células HL60. Las condiciones del cultivo celular, concentraciones del compuesto, y condiciones del ensayo fueron como se describió en la figura 5. Los resultados se expresan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.
- 15 Figura 7 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con citarabina, un análogo de pirimidina, en células Jurkat. El cultivo celular se realizó como se describe en la figura 1. ET-18-OCH₃ se añadió a una concentración final de 2,5 o 5,0 $\mu\text{g/ml}$ ("E2,5" y "E5", respectivamente), sin o en combinación con citarabina 10 o 40 μM ("Ara-C10" y "Ara-C40", respectivamente), y las células se incubaron durante 20 horas. La muerte celular se evaluó como se describió en la figura 1. Los resultados se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes.
- 20 Figura 8 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con citarabina en las células HL60. Las condiciones del cultivo celular, concentraciones del compuesto, y condiciones del ensayo fueron como se describió en la figura 7. Los resultados se expresan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.
- 25 Figura 9 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con etopósido, un inhibidor de la topoisomerasa II, en células Jurkat. El cultivo celular se realizó como se describió en la figura 1. ET-18-OCH₃ se añadió a una concentración final de 2,5 o 5,0 $\mu\text{g/ml}$ ("E2,5" y "E5", respectivamente), sin o en combinación con etopósido 1,0, 2,5 o 5,0 μM ("Eto1", "Eto2,5" y "Eto5", respectivamente), y las células se incubaron durante 20 horas. La muerte celular se evaluó como se describió en la figura 1. Los resultados se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes.
- 30 Figura 10 representa los efectos citotóxicos de ET-18-OCH₃ solo y en combinación con etopósido en células HL60. El cultivo celular, concentraciones del compuesto, y condiciones del ensayo fueron como se describió en la figura 9. Los resultados se expresan como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Ejemplos

- 35 Ejemplo de referencia 1: Determinación del efecto citotóxico de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfolina en diferentes líneas celulares hematológicas tumorales humanas
- Fueron utilizadas las siguientes líneas celulares humanas:
1. KMS-12-BM (DMSZ n° ACC 551), células de médula ósea; mieloma/plasmocitoma; ninguna de las alteraciones genéticas definidas en este documento; Chesi, M. et al. (2001), *supra*.
 - 40 2. K562 (ATCC n° CCL-243); células de la médula ósea; CML; ninguna de las alteraciones genética que se definen en este documento; Delgado, M. D. et al. (2001), *supra*.
 3. RPMI8226 (ATCC n° CLL-155); células de sangre periférica; mieloma/plasmocitoma; K12-G> A K-ras mutación genética (GGT \rightarrow GCT en el codón 12); Chesi, M. et al (2001), *supra*.
 - 45 4. OPM-2 (ATCC n° CRL-13007); células de linfoblastos; mieloma; traslocación cromosómica t(4;14); K650E mutación del gen *FGFR3* (AAG \rightarrow GAG en el codón 650); Chesi, M. et al. (2001), *supra*.
 5. NCI-H929 (ATCC n° CRL-9068); células de médula ósea; mieloma/plasmocitoma; traslocación cromosómica t(4;14); N13-G> D N-ras de mutación genética (GGT \rightarrow GAT en el codón 13); Chesi, M. et al. (2001), *supra*.
 - 50 6. U266 (ATCC n° TIB-196); células de sangre periférica; mieloma/plasmocitoma, ninguna de las alteraciones genéticas definidas en este documento; Chesi, M. et al (2001), *supra*.

7. HL60 (ATCC nº CCL-240); células de sangre periférica; AML; N61-Q>R mutación genética N-ras (CAA →CGA en el codón 61); Bos, J.L. et al. (1984), *supra*.
8. Jurkat (ATCC nº TIB-152); células de sangre periférica; ALL; supresión de 2 pb e inserción de 9 pb en el codón 234 en el exón 7 del gen *PTEN* (originando los codones de parada en sentido descendente); Sakai, A. et al. (1998), *supra*.

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos en un volumen de 200 µl a una concentración de 1×10^6 células/ml. Después, las células se incubaron durante 20 horas con una concentración final de 5 µg/ml, 10 µg/ml, y 20 µg/ml de 1-O-octadecil-2-O-metilglicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH3), respectivamente. La muerte celular se evaluó mediante tinción de las células con 7-amino-actinomicina D (Calbiochem, Darmstadt, Alemania; concentración final 200 µg/ml) y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACS-Scan (BD Biosciences, San José, California, EE.UU.) como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Schmid, I. et al. (1994) *J. Immunol. Meth.* **170**, 145-157; Ayuk, F.A. et al. (2005) *Exp. Hematol.* **33**, 1531/1536).

Los resultados obtenidos en un experimento típico se resumen en la figura 1. Con la excepción de células U266, que aparentemente no responden a ET-18-OCH3 en absoluto, cuando se les expuso a ET-18-OCH3 todas las líneas celulares mostraron un efecto dependiente de la dosis. La aplicación de 20 µg/ml de ET-18-OCH3 originó la muerte celular casi completa en células RPMI8226, NCI-H929, y células HL60, respectivamente. En células OPM-2 aproximadamente el 75% de las células murieron tras la exposición a 20 µg/ml de ET-18-OCH3. Curiosamente, en aquellas líneas celulares que no albergaban ninguna de las alteraciones genéticas definidas en este documento, a saber, la traslocación cromosómica t(4;14), mutaciones genéticas de *ras*, *FGFR3*, y *PTEN*, respectivamente (es decir, en KMS-12-BM, K562 y U266), la citotoxicidad se redujo significativamente o incluso fue casi abolida. Estos resultados demuestran que la presencia de una o más de las alteraciones genéticas anteriores es una fuerte indicación de la susceptibilidad de una célula determinada al tratamiento con ET-18-OCH3.

Ejemplo 2: Determinación del efecto citotóxico de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina en combinación con diferentes agentes antineoplásicos en varias líneas celulares.

Se utilizaron los fármacos citostáticos siguientes: bortezomib (Velcade®; Janssen Cilag, Neuss, Alemania), un inhibidor del proteosoma 26S que se utiliza comúnmente para el tratamiento del mieloma múltiple; fludarabina (Sigma, St. Louis, EE.UU.), un análogo de purina que se utiliza principalmente en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LLC); citarabina (también referida como "arabinósido de citosina" o "Ara-C"; Sigma, St. Louis, EE.UU.), un análogo de pirimidina utilizado principalmente en el tratamiento de linfomas LMA y linfomas no Hodgkin, y etopósido (Sigma, St. Louis, EE.UU.), un inhibidor de la topoisomerasa II que se utiliza comúnmente en el tratamiento de los linfomas.

Las células se cultivaron de nuevo en placas de 96 pocillos de cultivo de tejidos en un volumen de 200 µl a una concentración de 1×10^6 células/ml. Después, las células se incubaron durante 20 horas con los fármacos respectivos. Se utilizaron las concentraciones finales siguientes (en general, las concentraciones empleadas resultaron con menos del 50% de citotoxicidad cuando se administraron solas): 2,5 µg/ml y 5,0 µg/ml de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH3); 5 ng/ml y 10 ng/ml de bortezomib; fludarabina 10 µM y 50 µM, citarabina 10 µM y 40 µM y etopósido 1 µM, 2,5 µM, y 10 µM, respectivamente. El efecto citotóxico de ET-18-OCH3 en combinación con bortezomib se determinó en células Jurkat, células HL60, y células RPMI8226, mientras que el efecto citotóxico de ET-18-OCH3 en combinación con citarabina, fludarabina y etopóxido, respectivamente, en células Jurkat y células HL60. La muerte celular se evaluó como se describe en el ejemplo 1.

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes Tablas 1 a 4 (los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes (células Jurkat y células RPMI8226) o 4 experimentos independientes (células HL60):

Tabla 1: Efecto de ET-18-OCH3 en combinación con bortezomib

Línea celular	ET-18-OCH3	Bortezomib	Citotoxicidad (%)
Jurkat	2,5 µg/ml		2,1±1,0
	5,0 µg/ml		13,1±5,3
		5 ng/ml	0,4±0,5

		10 ng/ml	3,6±1,4
	2,5 µg/ml	5 ng/ml	11,7±6,1
	2,5 µg/ml	10 ng/ml	18,3±3,4
	5,0 µg/ml	5 ng/ml	24,1±10,0
	5,0 µg/ml	10 ng/ml	37,5±7,4
HL60	2,5 µg/ml		11,3±7,3
	5,0 µg/ml		35,0±15,9
		5 ng/ml	2,7±1,9
		10 ng/ml	10,9±3,7
	2,5 µg/ml	5 ng/ml	26,3±11,0
	2,5 µg/ml	10 ng/ml	52,5±9,2
	5,0 µg/ml	5 ng/ml	53,6±16,7
	5,0 µg/ml	10 ng/ml	69,1±10,4
RPMI8226	2,5 µg/ml		11,2±8,1
	5,0 µg/ml		34,7±13,2
		5 ng/ml	7,3±4,5
		10 ng/ml	25,1±4,0
	2,5 µg/ml	5 ng/ml	29,7±8,3
	2,5 µg/ml	10 ng/ml	44,4±13,9
	5,0 µg/ml	5 ng/ml	53,6±16,7
	5,0 µg/ml	10 ng/ml	69,1±10,4

Tabla 2: Efecto de ET-18-OCH3 en combinación con fludarabina

Línea celular	ET-18-OCH3	Fludarabina	Citotoxicidad (%)
Jurkat	2,5 µg/ml		2,1±1,0
	5,0 µg/ml		13,1±5,3
		10 µM	2,4±0,9
		50 µM	6,2±2,4
	2,5 µg/ml	10 µM	5,1±2,6
	2,5 µg/ml	50 µM	18,0±5,0
	5,0 µg/ml	10 µM	25,1±3,9
	5,0 µg/ml	50 µM	36,1±9,9
HL60	2,5 µg/ml		11,3±7,3

	5,0 µg/ml		35,0±15,9
		10 µM	13,8±9,4
		50 µM	37,2±4,6
	2,5 µg/ml	10 µM	54,5±8,2
	2,5 µg/ml	50 µM	81,0±7,3
	5,0 µg/ml	10 µM	62,3±15,6
	5,0 µg/ml	50 µM	84,9±7,5

Tabla 3: Efecto de ET-18-OCH3 en combinación con citarabina

<u>Línea celular</u>	<u>ET-18-OCH3</u>	<u>Citarabina</u>	<u>Citotoxicidad (%)</u>
Jurkat	2,5 µg/ml		2,1±1,0
	5,0 µg/ml		13,1±5,3
		10 µM	11,1±0,5
		40 µM	12,4±1,2
	2,5 µg/ml	10 µM	22,7±6,5
	2,5 µg/ml	40 µM	20,5±5,5
	5,0 µg/ml	10 µM	39,5±7,0
	5,0 µg/ml	40 µM	40,5±11,1
HL60	2,5 µg/ml		11,3±7,3
	5,0 µg/ml		35,0±15,9
		10 µM	24,0±2,8
		40 µM	26,9±5,0
	2,5 µg/ml	10 µM	66,2±12,3
	2,5 µg/ml	40 µM	70,8±15,5
	5,0 µg/ml	10 µM	85,0±9,2
	5,0 µg/ml	40 µM	82,0±9,6

5

Tabla 4: Efecto de ET-18-OCH3 en combinación con etopósido

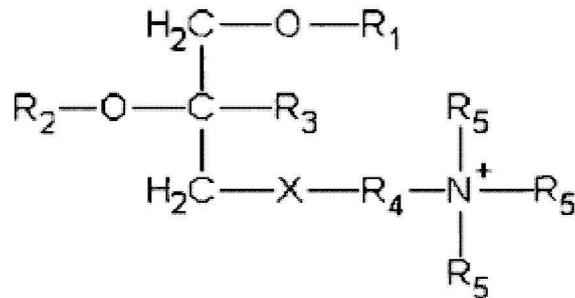
<u>Línea celular</u>	<u>ET-18-OCH3</u>	<u>Etopósido</u>	<u>Citotoxicidad (%)</u>
Jurkat	2,5 µg/ml		2,1±1,0
	5,0 µg/ml		13,1±5,3
		1,0 µM	5,9±1,1

		2,5 μ M	10,0 \pm 0,8
		5,0 μ M	16,8 \pm 8,4
	2,5 μ g/ml	1,0 μ M	10,1 \pm 2,3
	2,5 μ g/ml	2,5 μ M	20,8 \pm 3,3
	2,5 μ g/ml	5,0 μ M	26,0 \pm 6,6
	5,0 μ g/ml	1,0 μ M	33,4 \pm 11,0
	5,0 μ g/ml	2,5 μ M	40,3 \pm 13,2
	5,0 μ g/ml	5,0 μ M	37,6 \pm 8,5
HL60	2,5 μ g/ml		11,3 \pm 7,3
	5,0 μ g/ml		35,0 \pm 15,9
		1,0 μ M	4,1 \pm 0,7
		2,5 μ M	10,7 \pm 5,4
		5,0 μ M	23,3 \pm 8,2
	2,5 μ g/ml	1,0 μ M	22,0 \pm 11,4
	2,5 μ g/ml	2,5 μ M	58,0 \pm 18,3
	2,5 μ g/ml	5,0 μ M	74,1 \pm 15,3
	5,0 μ g/ml	1,0 μ M	59,2 \pm 19,8
	5,0 μ g/ml	2,5 μ M	81,1 \pm 8,2
	5,0 μ g/ml	5,0 μ M	85,6 \pm 7,7

- 5 Por los resultados anteriores es evidente que la adjunción de 1-O-octadecil-2-O-metil-glicero- 3-fosfocolina (ET-18-OCH₃) con cualquiera de los agentes antineoplásicos ensayados da lugar a un mejor efecto citotóxico en cualquiera de las líneas celulares empleadas. Es importante destacar que las diferentes combinaciones de ingredientes activos actuaron no sólo en forma aditiva, sino de una forma sinérgica. Por lo tanto, este modo sinérgico de la acción permite la administración de dosis reducidas del fármaco con el fin de lograr la misma eficacia farmacéutica en comparación con una administración individual, lo que a su vez reducirá el riesgo de la aparición de efectos secundarios adversos.
- 10 La presente invención descrita en este documento de forma ilustrativa adecuadamente puede ser practicada en la ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no estén específicamente descritos en este documento. Así, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se leerán con criterio amplio y sin limitación.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de glicerol tri-sustituido según la fórmula (I)



- 5 o un enantiómero, o un diastereómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, en donde

X se selecciona del grupo que consiste en fosfato y sulfato;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₆-C₂₀;

R₂ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃ e hidroxialquilo C₁-C₃;

- 10 R₃ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₃;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₃ y cicloalquilo C₃-C₆; y

R₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y metilo;

- 15 y en donde el medicamento es una forma farmacéutica de dosificación sólida para administración oral y se usa en combinación con al menos un otro medicamento que comprende uno o más ingrediente/s activo/s adicional/es que es/son seleccionados de entre el grupo constituido por antimetabolitos, alcaloides de plantas, inhibidores de la topoisomerasa II e inhibidores del proteosoma.

2. El uso según la reivindicación 1, en donde X es fosfato, R₁ es -(CH₂)₁₇-CH₃, R₂ es CH₃, R₃ es H, R₄ es -(CH₂)₂, y R₅ es CH₃.

- 20 3. El uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la forma farmacéutica de dosificación sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, píldoras, cápsulas y gránulos.

4. El uso según la reivindicación 3, en donde el medicamento es una forma de dosificación entérica.

- 25 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las neoplasias malignas hematológicas se seleccionan del grupo que consiste en la leucemia, linfoma, mieloma múltiple, y síndrome mielodisplásico, y la leucemia preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide crónica, y leucemia linfoide crónica; o con el linfoma preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin.

6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los antimetabolitos se seleccionan del grupo que consiste en metotrexato, análogos de purina, y análogos de pirimidina.

- 30 7. El uso según las reivindicaciones 1 a 6, en donde el otro medicamento se selecciona del grupo que consiste en metotrexato, fludarabina, clofarabina, pentostatina, cladribina, citarabina, decitabina, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido y bortezomib.

- 35 8. La combinación de medicamentos como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas, en donde las neoplasias malignas hematológicas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en la leucemia, linfoma, mieloma múltiple y síndrome mielodisplásico.

9. Un método *in vitro* para determinar la susceptibilidad de una o más células malignas a una combinación de medicamentos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método:
- (a) determinar el alcance de la expresión del gen receptor Fas en las una o más células malignas.
10. El método *in vitro* según la reivindicación 9, que comprende además:
- 5 (b) determinar uno o más de lo siguiente en las una o más células malignas:
- (i) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *ras*;
 - (ii) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *FGFR3*; y
 - (iii) la presencia o ausencia de una o más mutaciones del gen *PTEN*,
- 10 en donde la presencia o ausencia de las una o más mutaciones del gen *FGFR3* se determina preferiblemente en la presencia concomitante de la traslocación cromosómica t(4;14).
11. El método *in vitro* según la reivindicación 9 o 10, que comprende además:
- (c) comparar los resultados de las mediciones obtenidas en (a) y/o (b) con las obtenidas en una o más células de control.
- 15 12. Un kit que comprende una combinación de medicamentos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

FIG. 1

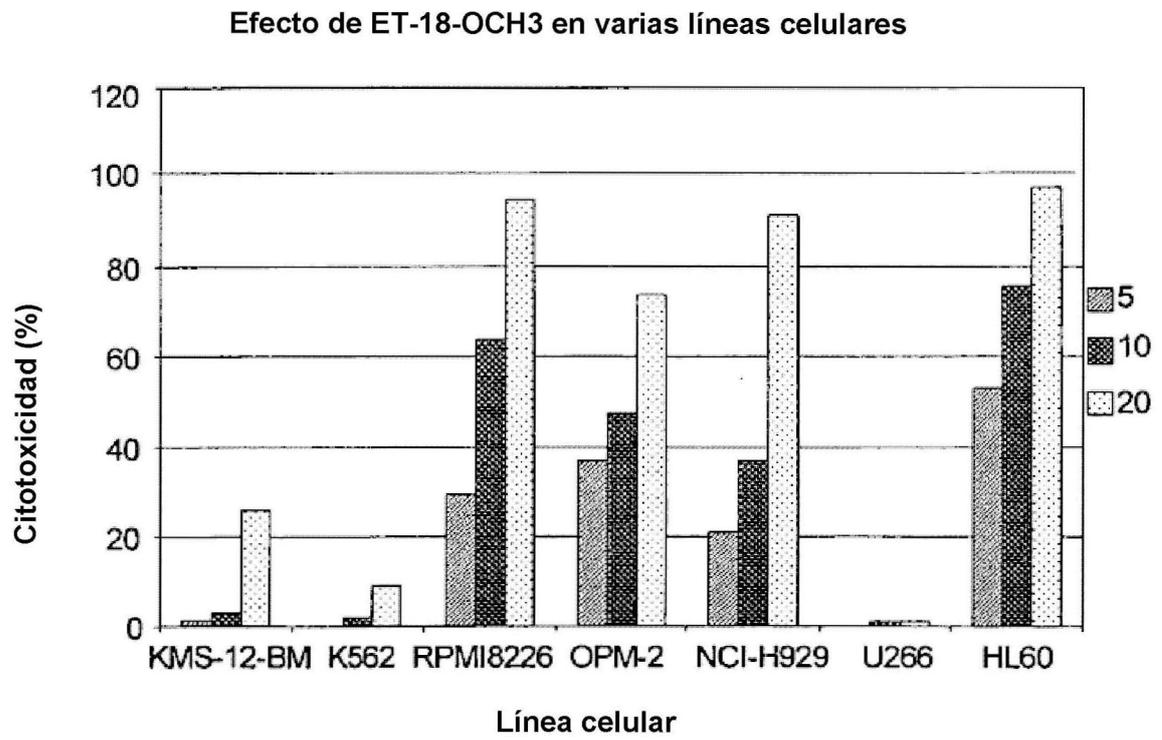


FIG. 2

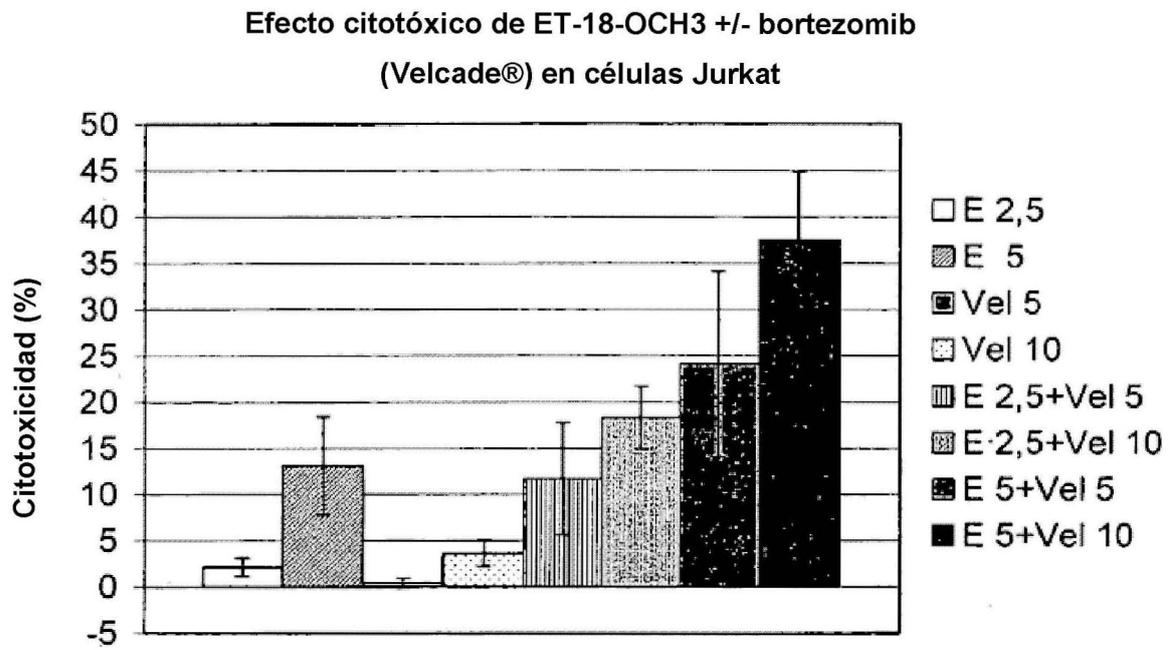


FIG. 3

**Efecto citotóxico de ET-18-OCH3 +/- bortezomib
(Velcade®) en células HL60**

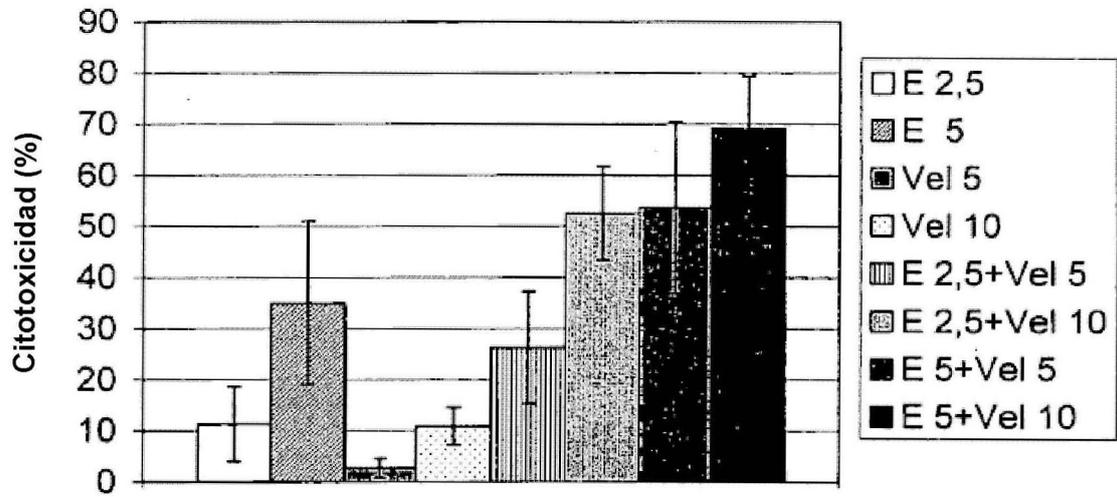


FIG. 4

**Efecto citotóxico de ET-18-OCH3 +/- bortezomib
(Velcade®) en células RPMI8226**

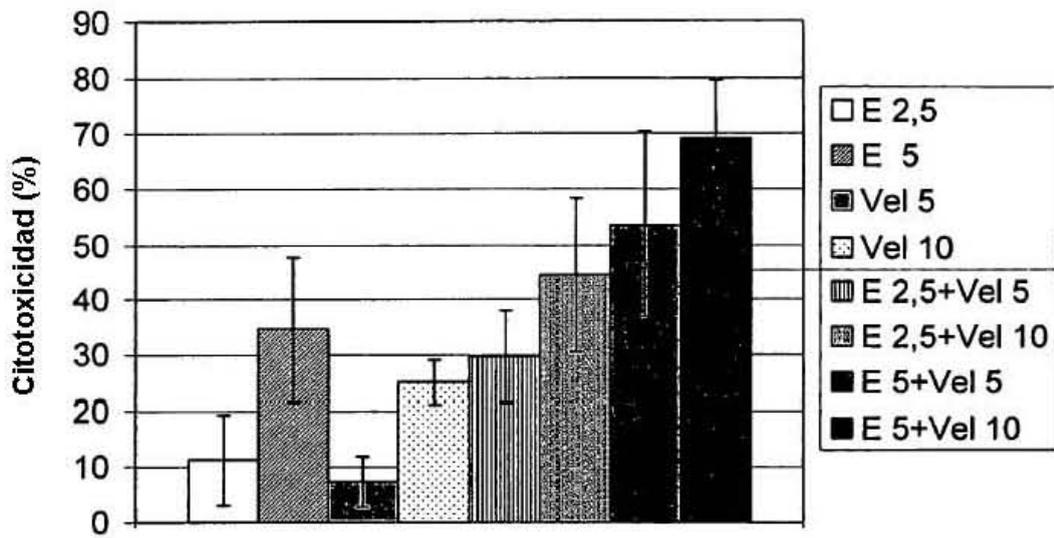


FIG. 5

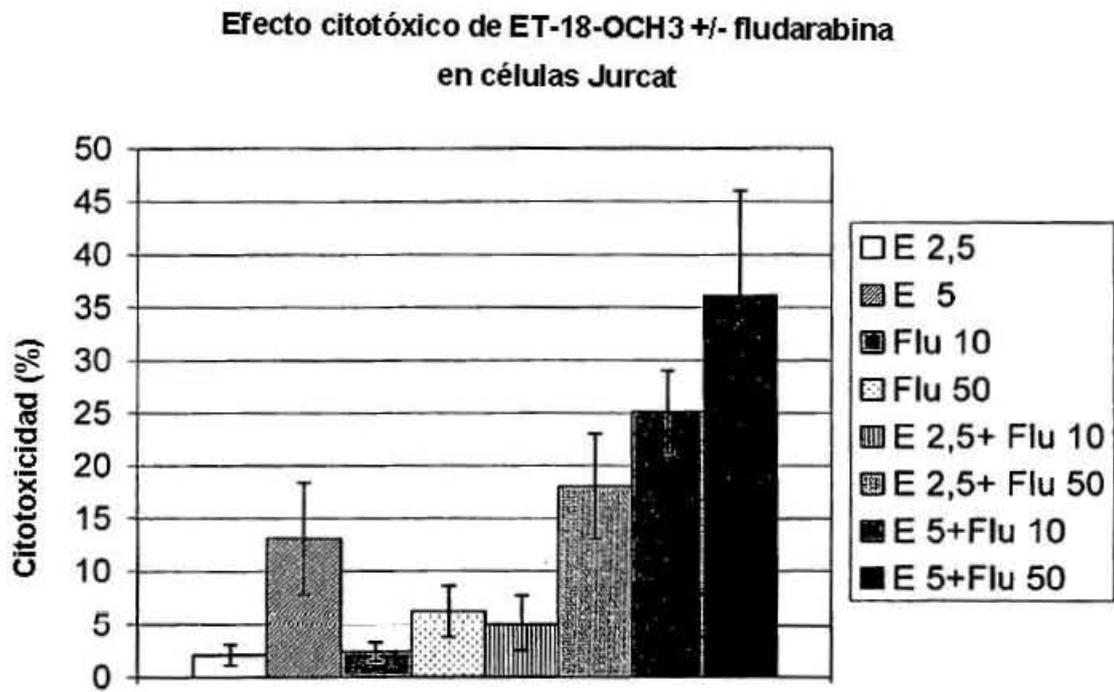


FIG. 6

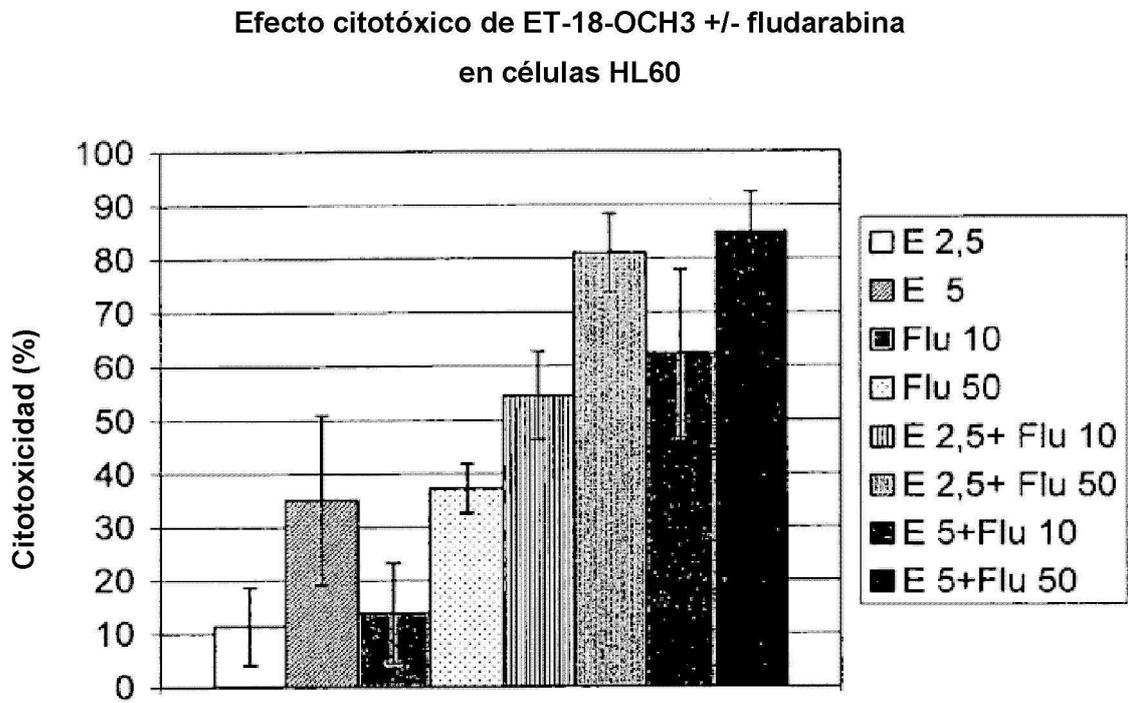


FIG. 7

**Efecto citotóxico de ET-18-OCH3 +/- citarabina
en células Jurkat**

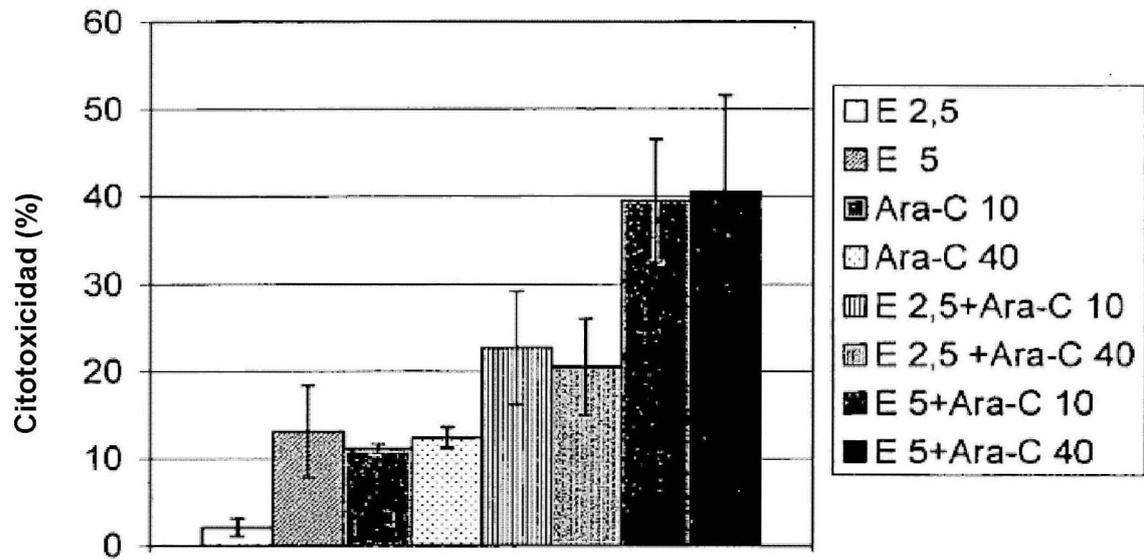


FIG. 8

**Efecto citotóxico de ET-18-OCH3 +/- citarabina
en células HL60**

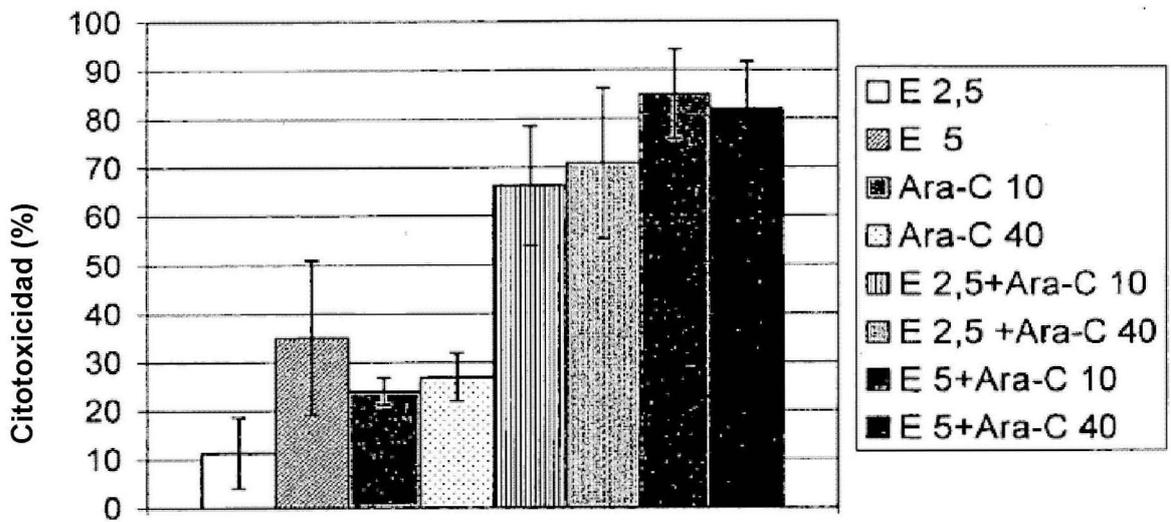


FIG. 9

**Efecto citotóxico de ET-18-OCH3 +/- etopósido
en células Jurkat**

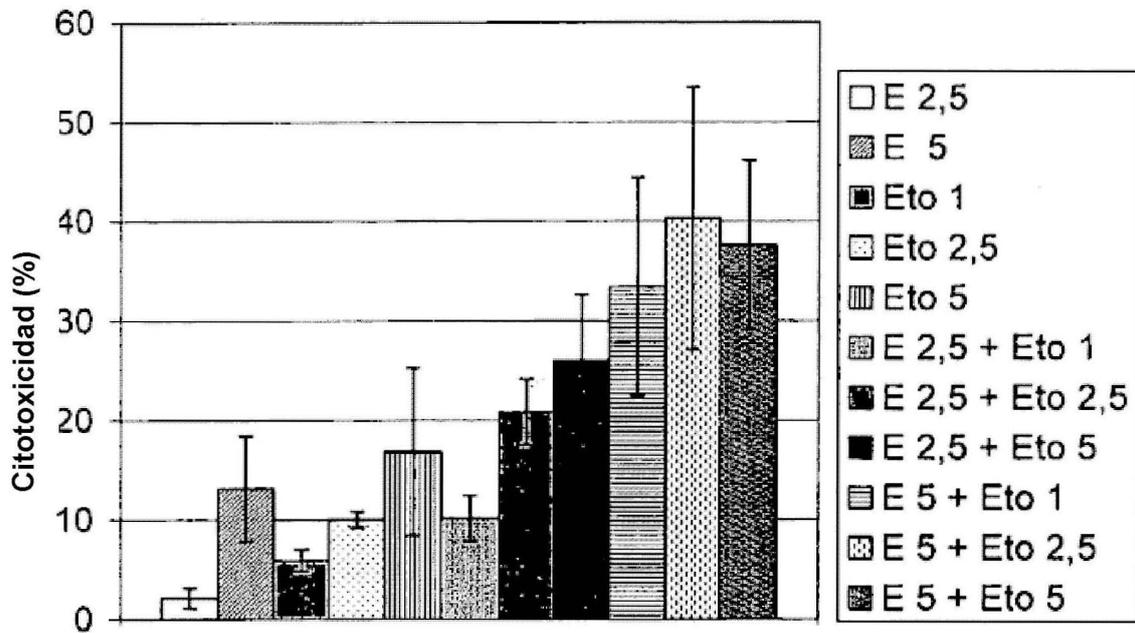


FIG. 10

**Efecto citotóxico de ET-18-OCH3 +/- etopósido
en células HL60**

