

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 586**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07711104 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1997506**

54 Título: **Uso del inhibidor de CK2 para el tratamiento y la quimiosensibilización de tumores refractarios a fármacos anticancerosos**

30 Prioridad:

28.02.2006 CU 492006

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

20.03.2013

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (50.0%)
Ave. 31 entre 158 y 190 Cubanacan, Playa
Ciudad de La Habana 10600, CU y
BIOREC S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PEREA RODRÍGUEZ, SILVIO, ERNESTO;
PERERA NEGRÍN, YASSER;
RODRÍGUEZ ULLOA, ARIELIS;
GIL VALDÉS, JEOVANIS;
RAMOS GÓMEZ, YASSEL;
CASTELLANOS SERRA, LILA, ROSA;
BETANCOURT NÚÑEZ, LÁZARO, HIRAM;
SÁNCHEZ PUENTE, ANIEL;
FERNÁNDEZ DE COSSIO DORTA DUQUE,
JORGE;
ACEVEDO CASTRO, BORIS, ERNESTO;
GONZÁLEZ LÓPEZ, LUIS, JAVIER;
BESADA PÉREZ, VLADIMIR;
ALONSO, DANIEL, FERNANDO y
GOMEZ, DANIEL, EDUARDO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 586 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 del inhibidor de CK2 para el tratamiento y la quimiosensibilización de tumores refractarios a fármacos anticancerosos

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere al campo de la oncología molecular y experimental, en particular a la descripción de una combinación farmacéutica dirigida al tratamiento y/o quimiosensibilización de tumores refractarios a citostáticos convencionales.

Técnica anterior

- 10 En las últimas tres décadas, el uso de fármacos químicos como citostáticos para la terapia del cáncer constituye una de las elecciones como tratamiento de primera línea para algunos tumores sólidos y hematopoyéticos. Los fármacos químicos usados más habitualmente para la terapia del cáncer son: Cisplatino, taxoles, alcaloides de la vinca, doxorubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida entre otros (Jackman A.L., Kaye S., Workman P. (2004) The combination of cytotoxic and molecularly targeted therapies-can it be done? Drug Discovery Today 1:445-454). No obstante, los resultados de ensayos clínicos exhiben un índice terapéutico bajo para este tipo de fármaco en la
- 15 terapia contra el cáncer, como se pone de manifiesto mediante el mínimo beneficio terapéutico junto con el perfil de toxicidad elevada observada en los pacientes (Schrader C., y col., M. (2005) Symptoms and signs of an acute myocardial ischemia caused by chemotherapy with paclitaxel (taxol) in a patient with metastatic ovarian carcinoma. Eur J Med Res 10:498-501). Por ejemplo, muchos autores están de acuerdo en que el cisplatino constituye el tratamiento de primera línea para el cáncer de pulmón, no obstante habitualmente se observa una
- 20 modesta eficacia con poca mejora de los síntomas clínicos y un incremento de 6 semanas de la supervivencia (Grillo R., Oxman A., Julian J. (1993) Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 11:1866-1871; Bouquet P.J., Chauvin F., et al (1993) Polychemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Lancet 342:19-21). Por tanto, las actuales estrategias para alcanzar un beneficio terapéutico óptimo se centran en combinaciones farmacéuticas basadas en fármacos citostáticos convencionales junto con
- 25 terapias moleculares dirigidas. Algunos de los fármacos anticancerosos actuales se clasifican como terapia dirigida al cáncer, por ejemplo Gleevec (Imatinib) que está dirigido a la Abl quinasa que, a su vez, desempeña un papel esencial en el desarrollo de la leucemia mieloide crónica (Giles J.F., Cortes J.E., Kantarjian H.M. (2005) Targeting the Kinase Activity of the BCR-ABL Fusion Protein in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. Current Mol Med 5:615-623), también Iressa cuyo objetivo es la tirosina quinasa asociada con el receptor del factor de
- 30 crecimiento epidérmico (EGF) (Onn A., Herbst R.S. (2005) Molecular targeted therapy for lung cancer. Lancet 366:1507-1508) y Velcade (Bortezomib) que bloquea la degradación proteica sobre la maquinaria del proteasoma (Spano J.P., y col., (2005) Proteasome inhibition: a new approach for the treatment of malignancies. Bull Cancer 92:E61-66), entre otros. Considerando que los mecanismos inespecíficos de los quimioterapéuticos convencionales convergen sobre la anulación de la mitosis celular, el uso de nuevas terapéuticas dirigidas contra
- 35 el cáncer proporciona grandes perspectivas para alcanzar combinaciones farmacéuticas que producen sinergia del efecto antitumoral.

- Por otro lado, el fenómeno de la resistencia a fármacos se ha reconocido como causa principal del fallo de la terapia del cáncer cuando se usan agentes quimioterapéuticos. A pesar de que la concentración subóptima del fármaco sobre el medio tumoral podía influir sobre las resistencias a fármacos, otros factores como el origen celular
- 40 desempeñan un papel esencial sobre la quimiorresistencia para muchos tumores. La resistencia a los fármacos es un fenómeno multifactorial que depende de múltiples mecanismos independientes que implican detoxificación intracelular, cambios sobre la respuesta celular, tolerancia al estrés y defectos en las vías de señalización de la apoptosis (Luqmani A. (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Med Princ. Pract 14:35-48). La glicoproteína P y la glutatión-S-transferasa son las proteínas principales que participan en el proceso de detoxificación intracelular ligado al fenómeno de resistencias a fármacos en el cáncer (Saeki T., Tsuruo T., Sato W., Nishikawa K. (2005) Drug resistance in chemotherapy for breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol 56:84-89) (Hara T., y col., (2004) Glutathione S-transferase P1 has protective effects on cell viability against camptothecin. Cancer Letters 203:199-207). Se ha notificado que otras proteínas como las beta-tubulinas están implicadas en el
- 45 fenómeno de resistencia a fármacos y cuyos niveles se correlacionan directamente con la resistencia del tumor a Paclitaxel (Orr G.A., y col., (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. Oncogene 22:7280-7295). De otro modo, se ha notificado que la resistencia al cisplatino está afectada por la sobreexpresión de diferentes proteínas, como la T-plastina (Hisano T., y col., (1996) Increased expression of T-plastin gene in cisplatin-resistant human cancer cells: identification by mRNA differential display. FEBS Letters 397:101-107), la proteína del shock térmico (HSP70) y (HSP90) (Jaattela M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. Exp Cell Res 248:30-43) y el factor de transcripción YB1 (Fujita T., y col., (2005) Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel. Clin Cancer Res 11:8837-8844). Adicionalmente, se ha notificado que la exacerbación de la glicólisis y las
- 50 vías del piruvato desempeñan un papel esencial sobre el fenómeno de quimiorresistencia observada en las células tumorales (Boros L.G., y col., (2004) Use of metabolic pathway flux information in targeted cancer drug design. Drug Disc. Today 1:435-443).
- 60

Informes de diferentes grupos han indicado la existencia de un conjunto de proteínas que inhiben la apoptosis o incrementan la supervivencia celular sobre las células tumorales, de modo que contribuyen al fenómeno de la quimiorresistencia de los tumores. Uno de los ejemplos es la proteína nucleofosmina, que desempeña un papel central sobre la estimulación del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis y se ha considerado un marcador de mal pronóstico en el cáncer (Ye K. (2005) Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4:918-923). Asimismo, la enzima CK2 desempeña un importante papel sobre la supervivencia celular y en la resistencia de células tumorales a la apoptosis (Tawfic S., Yu S., Wang H., Faust R., Davis A., Ahmed K. (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* 16:573-582). Los hallazgos anteriores han revelado la elevación de la actividad de CK2 de 3 a 7 veces e tumores sólidos epiteliales respecto a los tejidos normales (Tawfic S., Yu S., y col., (2001) Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol Histopatol.* 16:573-582; Faust R.A., Gapany M., y col., (1996) Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation. *Cancer Letters* 101:31-35). Además, la actividad de CK2 es un importante acontecimiento celular para la transformación maligna y constituye un marcador de la progresión tumoral (Seldin D.C., Leder P. (1995) Casein Kinase II α transgene induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle. *Science* 267:894-897). El hecho de que la fosforilación de CK2 representa una fuerte señal para proteger las células tumorales de la apoptosis, conduce a la consideración de esta enzima como mediador antiapoptótico sobre la fisiología celular (Ahmed K., Gerber D.A., Cochet C. (2002) Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* 12:226-229; Torres J., Rodríguez J., y col., (2003) Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem*, 278:30652-60).

En conjunto, la fosforilación de CK2 es un acontecimiento bioquímico que representa una posible diana para la terapia del cáncer y los inhibidores específicos de este acontecimiento podrían conducir a candidatos a fármacos con perspectivas para el tratamiento del cáncer.

Diferentes grupos han desarrollado diferentes enfoques para inhibir la fosforilación de CK2 usando dos abordajes independientes: a) Inhibición directa de la subunidad catalítica alfa de CK2, b) apuntar directamente al dominio ácido de los sustratos de CK2 (patente WO 03/054002 y Perea S.E., y col., (2004) Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide impairing the phosphorylation by the protein kinase CK2. *Cancer Res.* 64:7127-7129). Usando ambos abordajes, los autores han demostrado la prueba del principio de que la inhibición de CK2 conduce a la apoptosis de las células tumorales. Estos hallazgos refuerzan la validación experimental de CK2 como diana adecuada para desarrollar fármacos anticancerosos.

Los estudios proteómicos comparativos junto con los estudios en desarrollo con biología molecular han permitido, en parte, la comprensión de los mecanismos moleculares implicados tanto en la transformación maligna de las células como en la quimiorresistencia tumoral. Por tanto, los regímenes terapéuticos para el cáncer deberán centrar su atención en conseguir combinaciones de fármacos eficaces que reduzcan considerablemente la toxicidad y también que reduzcan la posibilidad de que surjan quimiorresistencias.

Por tanto, uno de los principales objetivos hoy en día en la terapia contra el cáncer es incrementar el índice terapéutico de los actuales fármacos citostáticos reduciendo la dosis eficaz y la toxicidad intrínseca mostrada por este tipo de medicamentos. Otra estrategia actual es evitar la quimiorresistencia tumoral hacia los fármacos citostáticos convencionales.

Descripción detallada de la invención

La presente invención resuelve el problema mencionado anteriormente, ya que proporciona una combinación farmacéutica que contiene dos ingredientes: un inhibidor de la fosforilación de CK2 (péptido P15) y un fármaco citostático farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención, "fármaco citostático farmacéuticamente aceptable" se refiere a todos los compuestos químicos citostáticos usados para quimioterapia del cáncer para tumores sólidos y para los de origen hematopoyético. Los citostáticos preferidos son cisplatino y carboplatino, paclitaxel y docetaxel, vincristina y vinblastina, 5-fluororacilo, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, mitomicina C, imatinib, iressa y velcade (bortezomib) mezclados con vehículos adecuados.

Dependiendo de la situación, los principios activos de esta combinación farmacéutica se pueden administrar de forma simultánea, por separado o secuencialmente. La administración de esta combinación farmacéutica se puede realizar por vías sistémica, tópica u oral. La presente invención también se refiere al tratamiento y/o el sorteo de la quimiorresistencia en tumores refractarios que se producen en seres humanos usando la combinación farmacéutica mencionada anteriormente.

Asimismo, la presente invención se refiere al uso de los ingredientes de esta combinación farmacéutica para preparar un medicamento para tratar tumores quimiorresistentes e incrementar el efecto antitumoral de los fármacos citostáticos citados en la presente invención.

El ejemplo 1 (Tabla 1) muestra que las combinaciones farmacéuticas descritas en la presente invención producen un efecto antineoplásico sinérgico *in vitro*. Por tanto, la combinación simultánea de dosis subóptimas del péptido P15

junto con cisplatino, paclitaxel, doxorubicina, vincristina, etopósido, mitomicina C, 5 fluorouracilo, imatinib, o lressa, alcanza una reducción de 10 o de 100 veces la dosis eficaz para cada fármaco citostático mencionado en la presente invención. La dosis eficaz es la dosis que alcanza un 50 % del efecto antineoplásico, que también se denomina concentración inhibidora del 50 % (CI50), en ensayos de proliferación *in vitro* en la presente invención, "dosis subóptimas" se refiere a una dosis menor que la CI50.

El ejemplo 2 ilustra la potenciación del efecto antitumoral *in vivo* usando esta combinación farmacéutica que contiene el péptido P15 junto con cisplatino (Figura 1A), ciclofosfamida (Figura 1B) y mitomicina C (Figura 1C). La combinación farmacéutica conduce a la completa regresión del tumor en un modelo animal relevante como el consistente en un tumor humano xenoinjertado en ratones atímicos. No obstante, el uso de los ingredientes de esta combinación farmacéutica como monoterapia produjo un ligero retraso del crecimiento tumoral en comparación con el efecto observado en el grupo tratado con placebo.

La administración secuencial de los ingredientes de esta combinación farmacéutica demuestra que el tratamiento con P15 evita la quimiorresistencia del tumor tanto *in vitro* como *in vivo*. En la presente invención, se entiende que "evitar la quimiorresistencia o la quimiosensibilización" se refiere al acontecimiento de reducir la dosis de fármaco necesaria para producir el 50 % del efecto antitumoral tras pretratamiento con el péptido P15. El ejemplo 3 ilustra el efecto del pretratamiento con péptido P15 en la quimiosensibilización de las células tumorales y produce una reducción de 10 a 100 veces la dosis de fármaco eficaz. De un modo similar, los datos mostrados en la Tabla 3 representan que la administración secuencial de la combinación farmacéutica evita la quimiorresistencia intrínseca de las células tumorales *in vitro*. En la presente invención, la quimiorresistencia *in vitro* se considera cuando el valor de la CI50 alcanza valores de concentración superiores a 1.000 μM .

Similar a los resultados *in vitro*, el pretratamiento con el péptido P15 *in vivo* evita la quimiorresistencia intrínseca del tumor (ejemplo 4) (Figura 2A, 2B, 2C).

El ingrediente de péptido P15 (secuencia de aminoácidos: CWMSPRHLGTC) se ha notificado previamente como inhibidor de CK2 (Perea S.E., y col., (2004) Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide impairing the phosphorylation by the protein kinase CK2. Cancer Res. 64:7127-7129). No obstante, este péptido reguló inesperadamente un grupo de proteínas sobre las células tumorales (Tabla 4) que refuerza y explica el efecto antitumoral sinérgico de los ingredientes de la combinación farmacéutica, así como la quimiosensibilización producida por el pretratamiento con el péptido P15. Por ejemplo, las proteínas reguladas por P15 desempeñan un papel esencial sobre el control de la proliferación y la apoptosis de las células tumorales, y estos mecanismos no son los mismos inducidos por el resto de los ingredientes de esta combinación farmacéutica, específicamente el fármaco citostático preferido en la presente invención.

Asimismo, otras proteínas que están reguladas por el ingrediente P15 son las implicadas en los mecanismos moleculares de la quimiorresistencia tumoral del fármaco citostático preferido en la presente invención. Estos resultados inesperados constituyen la base molecular de la quimiosensibilización del tumor producida por esta combinación farmacéutica cuando los ingredientes se administran de forma secuencial.

Un rasgo característico de la presente invención es el hecho de que concentraciones eficaces de los fármacos citostáticos en la combinación farmacéutica se reducen de 10 a 100 veces en comparación con la dosis eficaz cuando los fármacos citostáticos se usan solos. Esto significa que se produce una interacción sinérgica entre el péptido P15 inhibidor de CK2 y los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención. Desde el punto de vista práctico, esta interacción sinérgica significa que la toxicidad del medicamento basado en esta combinación farmacéutica es mucho menor que la observada para fármacos citostáticos solos.

De un modo similar, la quimiosensibilización del tumor provocada tras la administración secuencial de los ingredientes de esta combinación farmacéutica representa una gran ventaja, ya que permite tratar la quimiorresistencia que se observa con frecuencia en los tumores sólidos y en aquéllos de origen hematopoyético.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Potenciación del efecto antitumoral por la combinación farmacéutica en un modelo animal de cáncer: (A) representa la sinergia entre cisplatino + P15, (B) representa la sinergia entre ciclofosfamida + P15, (C) representa la sinergia *in vivo* de mitomicina C + P15.

Figura 2: Efecto de la quimiosensibilización del tumor por el péptido P15 *in vivo*: (A) representa la evitación de la quimiorresistencia hacia cisplatino, (B) representa la evitación de la quimiorresistencia hacia paclitaxel y (C) representa la evitación de la quimiorresistencia hacia doxorubicina.

Exposición detallada de los ejemplos

Procedimientos generales:

Cultivos celulares: La línea celular H-125 se obtuvo de un carcinoma de pulmón amicrocítico humano (NSCLC) y la línea celular SW948 se obtuvo de un carcinoma de colon humano. Ambas líneas celulares se

mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % de suero bovino fetal y gentamicina (50 µg/ml). Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂.

Ensayo de viabilidad celular: Para este fin, se añadieron a las células de cada placa 20 µl de tetrazolio (MTS) (Promega). Tras 2 horas a 37 °C, se midió la absorbancia a 492 nm. Por último, se estimaron los valores de CI50 a partir de las correspondientes curvas de dosis-respuesta usando el software "CurveExpert".

Modelo animal de cáncer: El modelo animal usado en la presente invención se basó en la implantación de tumores humanos en ratones atímicos (Nu/Nu, BALB/C). Brevemente, 5x10⁶ células H-125 se suspendieron en solución tamponada con fosfato (PBS) y se inocularon por vía subcutánea. Una vez iniciado el tumor (aproximadamente 30 mm³), se inició el tratamiento usando la combinación farmacéutica descrita en la presente invención. Para evaluar el efecto antitumoral de la combinación farmacéutica se midió el volumen de la masa tumoral y se calculó el correspondiente volumen usando la fórmula: $V = \text{anchura}^2 \times \text{longitud} / 2$.

Análisis del perfil de proteínas en los extractos celulares: Las células H-125 se trataron o no con el ingrediente péptido P15 de la combinación farmacéutica descrita en la presente invención durante 40 minutos. Después, las monocapas celulares se lavaron con PBS y las células se rasparon de la superficie. Después de dos lavados adicionales con PBS frío, los sedimentos celulares se resuspendieron en tris-HCl 10mM a pH 7,5, sacarosa 0,25M, EGTA 1 mM + cóctel de inhibidor de proteasa y se obtuvo la fracción proteica nuclear como se ha descrito anteriormente (González L.J., y col., (2003) Identification of nuclear proteins of small cell lung cancer cell line H82: An improved protocol for the analysis of silver stained proteins. Electrophoresis 24:237-252). Para analizar las proteínas reguladas por P15, los correspondientes extractos proteicos nucleares se resolvieron alternativamente mediante geles bidimensionales 2D (pH 4-7) y/o cromatografía de líquidos (nano HPLC) acoplada a espectrómetro de masas.

La presente invención se explica mediante los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1: Efecto sinérgico de la combinación del péptido P15 + fármacos citostáticos convencionales

Se evaluó el efecto sinérgico antineoplásico entre el ingrediente péptido P15 combinado con diferentes fármacos citostáticos en las siguientes condiciones experimentales: Células H-125 se sembraron en placas de 96 pocillos y a cada placa se añadió el péptido P15 a 10 y 50 µM. De forma simultánea, cada uno de los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención se añadió a dosis que varían de 1 a 2.000 nM y la incubación se prolongó durante 72 horas en las mismas condiciones. Por último, la viabilidad celular y los valores de CI50 se determinaron como se ha descrito anteriormente en la presente invención. Los resultados mostrados en la Tabla 1 demuestran que los valores de CI50 para cada fármaco citostático se reducen de 10 a 100 veces cuando se combinan de forma simultánea con el ingrediente P15 bien a 10 o bien a 50 µM. Estos resultados demuestran claramente la potenciación del efecto antitumoral de la combinación farmacéutica que contiene el péptido P15 y los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención como ingredientes.

Tabla 1. Interacción sinérgica antineoplásica mediante la administración simultánea de los ingredientes en esta combinación farmacéutica.

Variante	Fármaco citostático solo	Fármaco citostático + P15 (90 µM)	Fármaco citostático + P15 (50 µM)
Cisplatino	720 nM	530 nM	70nM
Paclitaxel	17 nM	8 nM	3 nM
5-Fluorouracilo	1.200 nM	420 nM	60 nM
Vincristina	856 nM	100 nM	8 nM
Doxorubicina	423 nM	200 nM	76 Nm
Ciclofosfamida	2.400 nM	1004 nM	85 Nm
Mitomicina C	994 nM	93 nM	9 Nm
Imatinib	600 nM	200 nM	58 Nm
Velcade	2.000 nM	1.200 nM	700 Nm
Iressa	689 nM	174 nM	47 nM

Ejemplo 2: Potenciación del efecto antitumoral por la combinación farmacéutica en un modelo animal de cáncer.

Para este fin se implantaron 5×10^6 células tumorales H-125 como se ha mencionado anteriormente en la presente invención en ratones atímicos BALB/C de 6-8 semanas de edad. Después de iniciado el tumor, se administraron los ingredientes de la combinación farmacéutica del siguiente modo: el péptido P15 en solución salina se administró por vía intraperitoneal a 0,5 mg/kg/día durante 5 días. De forma concomitante, se realizó una inyección intraperitoneal de cisplatino (Figura 1A) o ciclofosfamida (Figura 1B) o mitomicina (Figura 1C) a 1 mg/kg/día en la misma frecuencia. Los fármacos citostáticos también se suspenden en solución salina. El volumen tumoral se registró como se ha descrito anteriormente en la presente invención. Los resultados mostrados en las Figuras 1A, 1B y 1C indican que la combinación farmacéutica potencia el efecto antitumoral cuando los ingredientes se administran de forma simultánea y como se observó mediante la regresión tumoral completa. De otro modo, cuando los ingredientes se administran como monoterapia sólo se observó un ligero efecto antitumoral con respecto al grupo tratado con placebo. Por tanto, los autores también demuestran la interacción sinérgica entre los ingredientes de esta combinación farmacéutica en un modelo de cáncer preclínico sobresaliente.

Ejemplo 3: Efecto del péptido P15 en la evitación de la quimiorresistencia *in vitro*.

En este ensayo, los inventores evaluaron el efecto de la combinación farmacéutica en el fenómeno de evitación de la quimiorresistencia cuando los ingredientes se administran de forma secuencial. Para este fin, se sembraron células H-125 a 2.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos y tras 24 horas se añadió 20 μ M del péptido P15. Tras 16 horas de incubación con el ingrediente péptido P15, las monocapas celulares se lavaron dos veces con solución salina. Por último, los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención se añadieron a una concentración que varía de 1 a 2.000 nM y la incubación se prolongó durante 72 horas. Al final, la viabilidad celular y los valores de CI50 para cada fármaco citostático se determinaron como se ha descrito previamente en la presente invención. Los resultados mostrados en la Tabla 2 demuestran que el pretratamiento de las células tumorales con el ingrediente péptido P15 aumenta la sensibilidad de estas células a cada uno de los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención. Además, los autores evaluaron el efecto del pretratamiento con P15 en células SW948 que son resistentes intrínsecamente al efecto de los fármacos citostáticos. Los resultados demostraron que el ingrediente péptido P15 también convierte a las células tumorales refractarias al fármaco intrínseco en células sensibles a los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención. (Tabla 3).

Los datos de los inventores demuestran que la administración secuencial del ingrediente péptido P15 con respecto a los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención conduce a la sensibilización de las células tumorales al efecto antineoplásico de dichos fármacos.

Tabla 2. Quimiosensibilización *in vitro* de la combinación farmacéutica mediante administración secuencial de los ingredientes

Variantes	Fármaco citostático solo	Fármaco citostático + pretratamiento con P15
Cisplatino	720 nM	20 Nm
Paclitaxel	17 nM	0,9 nM
5-Fluorouracilo	1.200 nM	105 nM
Vincristina	856 nM	83 nM
Doxorubicina	423 nM	72 nM
Ciclofosfamida	2.400 nM	100 nM
Mitomicina C	994 nM	20 nM
Imatinib	600 nM	10 nM
Velcade	2.000 nM	370 Nm
Iressa	689 nM	63 nM

Tabla 3. Quimiosensibilización *in vitro* de la combinación farmacéutica mediante administración secuencial de los ingredientes sobre células tumorales refractarias al fármaco intrínsecas

Variantes	Fármaco citostático solo	Fármaco citostático + pretratamiento con P15
Cisplatino	$\geq 1.000 \mu\text{M}$	120 μM
Paclitaxel	$\geq 1.000 \mu\text{M}$	97 μM
Doxorubicina	$\geq 1.000 \mu\text{M}$	320 μM

El efecto del ingrediente péptido P15 sobre la quimiosensibilización se verifica también mediante el perfil proteico regulado por fármaco observado en las células tumorales usadas en la presente invención. Para este fin se analizaron extractos proteicos nucleares procedentes de células H-125 tratadas o no con el ingrediente péptido P15 como se ha descrito previamente en la presente invención. La Tabla 4 muestra un grupo de proteínas que están reguladas por el ingrediente péptido P15 y por su función conocida, refuerza la base molecular de la quimiosensibilización del tumor producida por este péptido en la combinación farmacéutica en la presente invención.

Tabla 4. Perfil proteico regulado por P15

Proteínas reguladas por disminución por el ingrediente péptido P15	Tasa de inhibición
Nucleofosmina	48
T-plastina	3,34
Proteína del shock térmico (HSP-27, -70 y -90)	2,5
Factor de transcripción Y-box 1	3,33
Precursor de la eritropoyetina	120
S-glutación transferasa	4,87
Complejo activador del proteasoma	3,35
Enzima E1 activada de la ubiquitina	2,49
Glucosa-6-fosfato isomerasa	8,53
Gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa	6,62
Piruvato quinasa	8,34
Proteína tumoral controlada durante la traducción	4,32
Proteínas reguladas por aumento por el ingrediente péptido P15	Tasa de activación
Prohibitina	2,28
Tubulina alfa-1	3,23
Tubulina beta-2	2,56
Tubulina beta-3	3.15

Ejemplo 4: Quimiosensibilización *in vivo* producida por el ingrediente péptido P15

Para este fin se implantaron 5×10^6 células SW948 en ratones atímicos como se ha descrito previamente en la presente invención. Después de iniciado el tumor, la combinación farmacéutica se administró secuencialmente del siguiente modo: en primer lugar, el ingrediente péptido P15 se administró por vía intraperitoneal a 0,5 mg/kg/día durante 5 días. Después, se administró cisplatino (Figura 2A), paclitaxel (Figura 2B) y doxorubicina (Figura 2C) a 5 mg/kg/día durante 5 días más. Estos resultados demuestran que al pretratamiento *in vivo* con P15 puede invertir el

fenotipo quimiorrefractario de los tumores que se convierten en respondedores a los fármacos citostáticos preferidos en la presente invención. Estos hallazgos también proporcionan las pruebas de que la combinación farmacéutica en la presente invención puede evitar la resistencia tumoral intrínseca observada habitualmente cuando los ingredientes se administran secuencialmente.

REIVINDICACIONES

1. Combinación farmacéutica para administración simultánea, por separado o secuencial, que contiene un inhibidor peptídico del sitio de fosforilación sobre los sustratos de CK2 junto con un fármaco citostático farmacéuticamente aceptable mezclado con vehículos adecuados, en la que el inhibidor peptídico del sitio de fosforilación sobre los sustratos de CK2 comprende el péptido P15 (CWMSPRHLGTC).
- 5 2. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fármaco citostático es un compuesto químico que pertenece a platinos, taxoles y alcaloides de la vinca.
3. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dichos platinos están seleccionados de carboplatino y cisplatino, dichos taxoles están seleccionados de paclitaxel y docetaxel, y dichos alcaloides de la vinca están seleccionados de vincristina y vinblastina.
- 10 4. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fármaco citostático está seleccionado de 5-fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida, mitomicina C, Velcade (bortezomib), Iressa e Imatinib.
- 5 5. Una combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 15 6. Una combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de tumores sólidos y hematopoyéticos que son resistentes a fármacos citostáticos farmacéuticamente aceptables y en la que los ingredientes de la combinación farmacéutica se administran de forma simultánea, por separado o secuencialmente.
- 20 7. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 5 o para su uso en el tratamiento de tumores sólidos y hematopoyéticos de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el inhibidor del sitio de fosforilación sobre los sustratos de CK2 es un péptido.
- 25 8. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 6 o para su uso en el tratamiento de tumores sólidos y hematopoyéticos de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el inhibidor del sitio de fosforilación sobre los sustratos de CK2 se expresa en un vector de ADN.

Figura 1

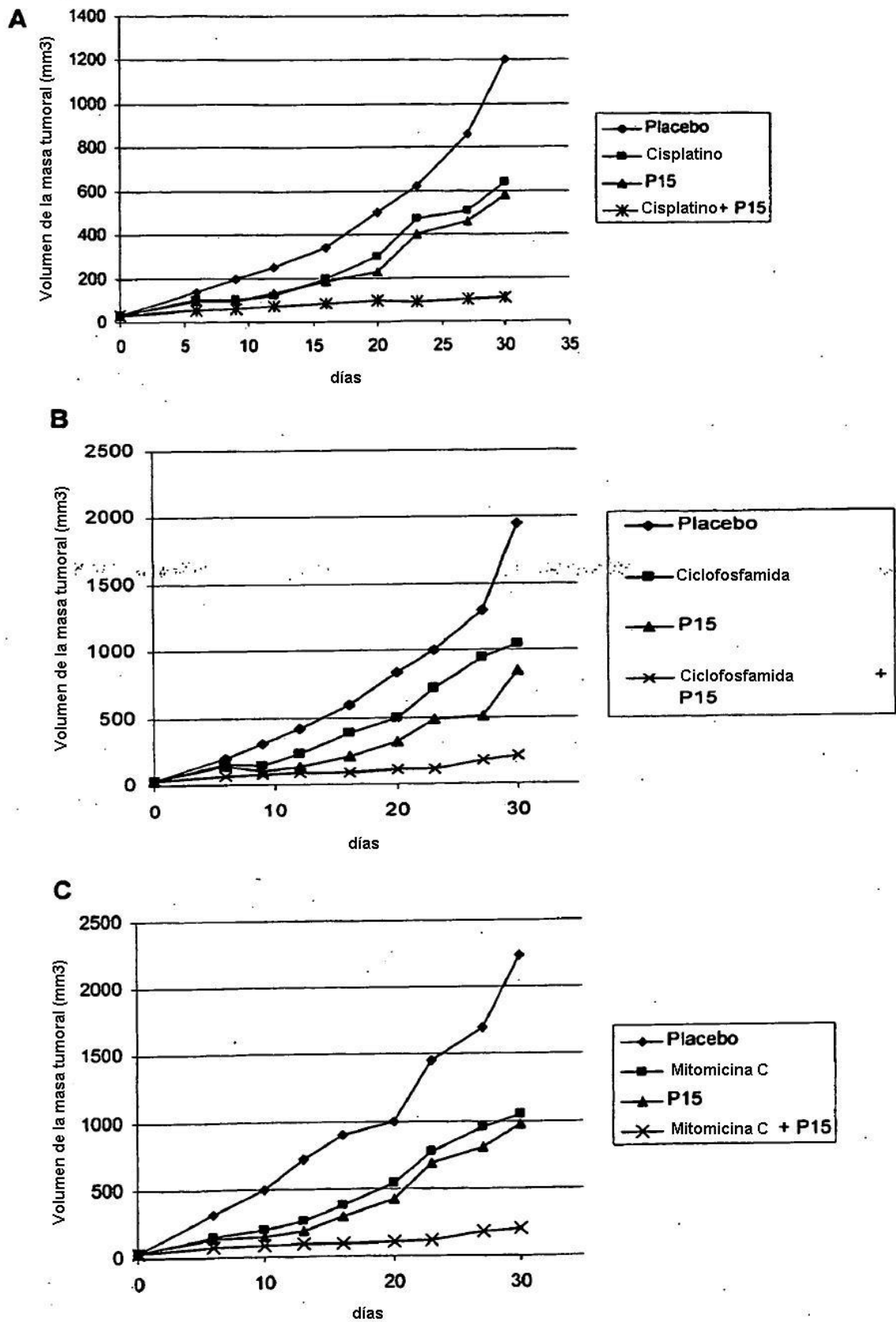


Figura 2

