

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 323**

51 Int. Cl.:

A61K 31/353 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008** **E 08775866 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013** **EP 2175849**

54 Título: **Tratamiento de melanoma**

30 Prioridad:

06.07.2007 GB 0713116

07.09.2007 US 967837 P

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

30.05.2013

73 Titular/es:

E-THERAPEUTICS PLC (100.0%)
17 Blenheim Office Park, Long Hanborough
Oxfordshire OX29 8LN , GB

72 Inventor/es:

YOUNG, MALCOLM, PHILIP;
YATES, CATHERINE, MARY;
IDOWU, OLUSOLA, CLEMENT y
CHARLTON, JULIE, ANN

74 Agente/Representante:

TRULLOLS DURÁN, María Del Carmen

ES 2 405 323 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

Tratamiento del melanoma

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona medicamentos para el tratamiento del melanoma. Más particularmente, la presente invención proporciona dexamabinol, o una sal del mismo, para el tratamiento del melanoma.

10

ANTECEDENTES

15

La incidencia de casos de melanoma se ha duplicado cada año desde 1940. El melanoma constituye actualmente el sexto tipo de cáncer más común en hombres, y el séptimo tipo de cáncer más común en mujeres. Su incidencia está aumentando en todo el mundo (Parker, S *et al*, 1997). El índice de supervivencia a 5 años para el melanoma es del 30 al 40%, implicando el melanoma maligno el mayor riesgo de mortalidad por metástasis (Jemal *et al*, 2001); la propagación de la enfermedad a órganos alejados tales como el hígado, los huesos y el cerebro, reduce los 5 años de supervivencia a menos del 12%. Actualmente no existe un tratamiento efectivo a largo plazo para los pacientes con melanoma metastásico (fase IV). Las pautas de quimioterapia estándar no proporcionan una ventaja significativa en lo que se refiere a la supervivencia a largo plazo de dichos pacientes y la quimioterapia se puede relacionar con un cierto grado de morbilidad debida a la toxicidad. Existe una necesidad evidente de desarrollar nuevos tratamientos dirigidos para el melanoma, tanto para evitar la evolución del cáncer como para tratar la enfermedad avanzada.

20

25

Se ha demostrado que la búsqueda de nuevos tratamientos efectivos para el melanoma constituye un reto muy complicado. La elevada resistencia a los antineoplásicos convencionales y a la radiación es una característica del melanoma. (Smalley and Eisen, 2003; Strauss *et al.*, 2003). La investigación ha pasado actualmente a identificar mutaciones genéticas del melanoma y las alteraciones correspondientes de las vías de transducción de señales, con la esperanza de que se pueden desarrollar tratamientos dirigidos más específicos. Se ha demostrado que diversas vías celulares importantes para la multiplicación celular, la apoptosis y la resistencia o las metástasis se activan en el melanoma. El melanoma tiende a desarrollar una pluralidad de anomalías, entre ellas la pérdida de las funciones de regulación o la adquisición de funciones antiapoptóticas o proliferativas. Por lo tanto, se pretenden agentes terapéuticos que puedan inhibir diversas vías de señalización simultáneamente. Además, la administración de antineoplásicos estándar junto con agentes nuevos puede aportar a las quimioterapias antineoplásicas tradicionales un nuevo impulso en el contexto del melanoma, si se inhibe la resistencia a la quimioterapia antineoplásica. Actualmente el reto comprende desarrollar agentes selectivos que se dirijan a estas vías aberrantes.

30

35

40

La activación aberrante de la vía del factor nuclear kappa B (NFkB) se ha relacionado con el crecimiento del melanoma, la metástasis y escape de la apoptosis. Los estudios *in vitro* han demostrado el enlace con el NFkB constitutivamente elevado en cultivos de melanoma humano en comparación con los melanocitos normales (Dhawan *et al*, 2004, McNulty *et al*, 2004). Se ha demostrado asimismo que la expresión de la subunidad NFkB, RelA es significativamente elevada en los nevos y melanomas humanos con respecto a la piel normal. La vía del NFkB constituye por lo tanto un objetivo potencial para el tratamiento del melanoma. La activación constitutiva del NFkB tiene varios efectos. Los estudios previos demostraron que la activación persistente de NFkB provocaba el aumento de la producción de quimiocinas (por ejemplo, CXCL8 y CXCL1) que estimulan la angiogénesis, estimulando de este modo la formación de tumores en el melanoma. Además, el NFkB activado es un importante regulador central de un cierto número de genes implicados en la antiapoptosis y la reproducción (Mayo *et al*, 1997). Aparte de su función antiapoptótica, el NFkB puede desempeñar asimismo un papel crítico en el desarrollo de la resistencia a la quimioterapia antineoplásica en el melanoma (Wang *et al*, 1999).

45

50

Se ha demostrado que la activación del NFkB en el melanoma se debe a la activación constitutiva del IKK, un regulador clave de la vía del NFkB (Yang and Richmond, 2001). Los inhibidores de la vía del NFkB y, en particular, los inhibidores del IKK, pueden constituir un medio muy efectivo para matar las células tumorales al orientar los mismos a la apoptosis.

55

Una molécula pequeña que dirija selectivamente la activación del NFkB en el melanoma sin afectar a las funciones del NFkB en las células normales presenta, por lo tanto un potencial terapéutico significativo, como agente único o junto con quimioterapias antineoplásicas existentes. La patente US n.º 2006/0025419 da a conocer la utilización de un inhibidor del NFkB (BMS-345541) para el tratamiento del melanoma.

60

Un compuesto particular de interés es el 1,1-dimetilheptil-(3S, 4S)-7-hidroxi- Δ^6 -tetrahidrocannabinol (dexamabinol) que se da a conocer en la patente US n.º 4.876.276.

Aparte de ser un bloqueador no competitivo del receptor NMDA, se ha demostrado que el dexamabinol inhibe el NFkB (Juttler *et al*, 2004).

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha descubierto actualmente un procedimiento para matar rápidamente células de melanoma que comprende poner en contacto la célula con el 1,1-dimetilheptil-(3S, 4S)-7-hidroxi- Δ^6 -tetrahidrocannabinol (INN dexamabinol), o una sal del mismo. La presente invención considera las células cancerosas de melanoma que son precancerosas, malignas, metastásicas o multirresistentes.

Por lo tanto, según un primer aspecto, la presente invención proporciona dexamabinol, o una sal del mismo, para el tratamiento del melanoma.

El tratamiento del melanoma según la presente invención puede comprender la inhibición de la actividad del NFkB en una célula cancerosa de melanoma, proporcionando dexamabinol, o una sal del mismo, a la célula.

Alternativamente, el tratamiento del melanoma puede comprender la inhibición de la oncogénesis de una célula cancerosa de melanoma poniendo en contacto la célula con una cantidad efectiva de dexamabinol, o una sal del mismo. La inhibición de la oncogénesis comprende provocar tanto la citotoxicidad como la apoptosis en la célula cancerosa.

Además, el tratamiento del melanoma según la presente invención puede comprender independiente, simultánea o secuencialmente la inhibición de la actividad del NFkB y de la oncogénesis de una célula cancerosa de melanoma.

El dexamabinol, o una sal del mismo, resulta ventajoso para el tratamiento del melanoma, entre otros aspectos, porque presenta una toxicidad reducida, menos efectos secundarios y/o una disminución de la resistencia en comparación con los antineoplásicos utilizados actualmente.

Se considera además que se pueda proporcionar un segundo agente terapéutico junto con el dexamabinol, o una sal del mismo, a una célula cancerosa de melanoma para el tratamiento y/o prevención de melanoma. El segundo agente puede comprender un antineoplásico, un inmunoterápico, un agente de genoterapia o de radioterapia. El segundo agente terapéutico se puede administrar con el dexamabinol, o una sal del mismo, independiente, simultánea o secuencialmente.

Las sales aptas del dexamabinol resultan muy conocidas y se describen en la técnica anterior. Se pueden utilizar sales de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos para realizar sales farmacéuticamente aceptables. Dichos ácidos comprenden, sin limitación, los ácidos fluorhídrico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, cítrico, succínico, maleico y palmítico. Las bases comprenden compuestos tales como los hidróxidos de sodio y de amonio. Los expertos en la materia están familiarizados con agentes de cuaternización que se pueden utilizar para realizar derivados de amonio cuaternario del dexamabinol farmacéuticamente aceptables. Estos comprenden, sin limitación, yoduros y sulfatos de metilo y etilo.

Por consiguiente, y en una forma de realización, la presente invención proporciona un uso del dexamabinol, o una sal del mismo, en la realización de un medicamento para el tratamiento del melanoma.

Se proporciona en particular un uso del dexamabinol, o una sal del mismo, en la realización de un medicamento que se puede administrar por vía tópica, por ejemplo, un medicamento que se puede administrar por vía tópica para el tratamiento del melanoma.

Además, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto para utilizar en un procedimiento de tratamiento del melanoma, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de dexamabinol y sales y/o combinaciones del mismo.

El dexamabinol y las sales y/o combinaciones del mismo son conocidos de por sí y se pueden preparar utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia o se pueden obtener comercialmente. En particular, el dexamabinol y los procedimientos para la preparación del mismo se describen en la patente US n.º 4.876.276.

Ventajosamente, el compuesto y las sales y/o combinaciones del mismo se pueden administrar por vía oral o intravenosa.

Por lo tanto, el compuesto se puede presentar como comprimido, cápsula, gragea, supositorio, suspensión, solución, inyección, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, implante, tópico, por ejemplo transdérmico, preparación tal como un gel, crema, pomada, aerosol o un sistema polimérico, o una forma para inhalación, por ejemplo, un aerosol o una formulación en polvo.

Las composiciones aptas para la administración oral comprenden comprimidos, cápsulas, grageas, suspensiones líquidas, soluciones y jarabes;

Las composiciones aptas para la administración tópica en la piel comprenden cremas, por ejemplo emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, pomadas, geles, lociones, ungüentos, emolientes, dispersiones coloidales, suspensiones, emulsiones, aceites, aerosoles, espumas, mousses y similares. Las composiciones aptas para la aplicación tópica pueden comprender asimismo, por ejemplo, vehículos de liposomas compuestos por lípidos o detergentes especiales.

Los ejemplos de otros aditivos, diluyentes o vehículos son:

para los comprimidos y las grageas - sustancias con función de relleno, por ejemplo, lactosa, almidón, celulosa microcristalina, talco y ácido esteárico; lubricantes / deslizantes, por ejemplo, estearato de magnesio y dióxido de silicio coloidal; disgregantes, por ejemplo, glicolato sódico de almidón y carmelosa sódica; para las cápsulas - almidón pregelatinizado o lactosa; para las soluciones orales o inyectables o los enemas - agua, glicoles, alcoholes, glicerina, aceites vegetales; para los supositorios - aceites naturales o endurecidos o ceras.

Puede resultar posible administrar el compuesto o sales y/o combinación del mismo o cualquier pauta posológica combinada tal como se ha descrito anteriormente, por vía transdérmica, por ejemplo, con un dispositivo de administración transdérmica o un vehículo apto o, por ejemplo, en una base de ungüento, que se puede incorporar en un parche para una administración controlada. Dichos dispositivos son ventajosos, ya que pueden permitir un período prolongado de tratamiento en lo que se refiere a, por ejemplo, un medicamento oral o intravenoso.

Los ejemplos de dispositivos de administración transdérmica pueden comprender, por ejemplo, un parche, apósito, vendaje o emplastro apto para liberar un compuesto o sustancia a través de la piel de un paciente. Un experto en la materia estará familiarizado con los materiales y las técnicas que se pueden utilizar para la administración transdérmica de un compuesto o sustancia y se proporcionan ejemplos de dispositivos de administración transdérmica en los documentos GB2185187, US3249109, US3598122, US4144317, US4262003 y US4307717.

Para el tratamiento del melanoma, la presente invención permite especialmente la administración de composiciones por vía tópica en la piel o por inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, o ambas. Además, el dexamabinol, o una sal del mismo, se puede administrar simultánea o secuencialmente mediante un procedimiento de inyección y por vía tópica para reducir el crecimiento de un tumor cutáneo.

Se prefieren en particular las composiciones de uso tópico.

La invención se ilustrará a continuación únicamente a título de ejemplo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Ejemplo 1

Inducción de la apoptosis por dexamabinol en estirpes celulares de melanoma humano

Métodos

3 Estirpes celulares de melanoma humano (A375, G-361, WM266-4) se mantuvieron en un medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, RU) que contenía suero fetal bovino (Sigma, RU) al 10% (v/v) termoinactivado y 2 mM de L-glutamato a 37 °C en CO₂ humidificado al 5%.

Se recogieron las células, se lavaron, y se volvieron a suspender en medio de cultivo y se procedió al recuento (Beckman-Coulter Vi-CELL XR). Las células se sembraron en medio de 240 pocillos de 384 placas de cultivo de tejidos en $1,6 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^5$ células/ml en muestras de 12,5 µl/pocillo. Se prepararon muestras de 50 µl de medio de cultivo en los pocillos exteriores. Se prepararon 2 placas por cada estirpe celular. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C, en CO₂ humidificado al 5%.

Se preparó dexamabinol en medio de cultivo a 2 veces la concentración final del ensayo a 125, 31,3, 7,81, 2,00, 0,49, 0,12, 0,031 y 0,008 µM (la concentración de sulfóxido de dimetilo (DMSO) se mantuvo constante durante todo el intervalo de dilución al 0,5%).

Se utilizó cisplatino como control positivo. Las concentraciones de los ensayos finales fueron de 10, 2,5, 0,63, 0,156, 0,039, 0,010, 0,002 y 0,0006 µg/ml. Se añadieron 12,5 µl por pocillo de diluciones de dexamabinol o de cisplatino a las placas en réplicas de 6. Se añadieron 12,5 µl de medio de cultivo a los medios de los pocillos de control. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, en CO₂ humidificado al 5%.

Se analizaron los niveles de la caspasa 3/7 mediante el kit de ensayo Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7. Se determinó la fluorescencia utilizando un lector de placas FlexStation® II384 al cabo de 1, 2, 3 y 4 horas después de la adición del sustrato de caspasa. En el análisis se utilizaron las lecturas de las 4 horas.

Se realizó el ensayo de viabilidad celular en paralelo en la misma placa para cada estirpe usando el reactivo CellTiter-Blue® (Promega). En pocas palabras, se añadieron 25 µl del reactivo CellTiter-Blue® (Promega) a cada pocillo. Se agitaron las placas durante 1 minuto a 500 rpm y se incubaron a 37 °C, con CO₂ al 5% durante 4 horas. Se determinó la fluorescencia utilizando un lector de placas FlexStation® II384 (570 nm de longitud de onda de excitación, 600 nm de longitud de onda de emisión, 590 nm de valor de corte). Las representaciones gráficas que muestran el efecto citotóxico del dexamabinol y del cisplatino se representan superpuestas en el mismo gráfico.

Resultados

La inducción de la apoptosis en estirpes celulares A375, G-361 y WM266-4 de melanoma tras 24 horas de incubación con cisplatino o dexamabinol se muestra en las figuras 1 a 3, respectivamente, y se resume en la Tabla 1. Se muestra asimismo el análisis de la viabilidad celular determinada mediante el ensayo CellTiter-Blue® que indica la citotoxicidad.

El cisplatino se utilizó como control positivo y se observó una respuesta citotóxica en las 3 estirpes celulares de melanoma con un valor aproximado de CI₅₀ de 20 a 60 µM. La inducción de la apoptosis no resultó tan fácil de cuantificar debido a las curvas de dosificación inadecuadas (G-361, WM266-4).

El dexamabinol provoca una respuesta citotóxica con unos valores de CI₅₀ comprendidos entre 10 y 21 µM en las 3 estirpes celulares de melanoma. La inducción de la apoptosis no se cuantificó en G-361 y A375 debido a unas curvas de dosis - respuesta inadecuadas. Una respuesta máxima en la apoptosis se produjo a 2,5 µM y descendió a la mayor concentración de 10 µM posiblemente debido a la lisis y a la pérdida celular.

Tabla 1: Efecto del dexamabinol en la inducción de la apoptosis y la multiplicación celular en 3 estirpes celulares de melanoma humano.

Estirpe celular	Cisplatino				Dexamabinol			
	↑Apoptosis (µM)	CE ₅₀	↓Viabilidad (µM)	CI ₅₀	↑Apoptosis (µM)	CE ₅₀	↓Viabilidad (µM)	CI ₅₀
A375	5,67**		21,8**		ND***		19,16**	
G-361	Aprox. 33,3-100**		18,00**		ND*		10,97***	
WM266-4	Aprox. 33,3-100***		62,00*		13,04***		20,87**	
ND - CE/CI ₅₀ no determinadas debido a una curva de dosis - respuesta inadecuada Posición * inducción débil de la apoptosis y disminución de la multiplicación (<35%) ** inducción moderada de la apoptosis y disminución de la multiplicación (35-70%) *** buena inducción de la apoptosis y disminución de la multiplicación (>70%)								

Los resultados se ilustran en las figuras 1 a 3, en las que;

la figura 1 ilustra los efectos del cisplatino (A) y del dexamabinol (B) en la apoptosis y el crecimiento de las células A375 de melanoma;

la figura 2 ilustra los efectos del cisplatino (A) y del dexamabinol (B) en la apoptosis y el crecimiento de las células G-361 de melanoma; y

la figura 3 ilustra los efectos del cisplatino (A) y del dexamabinol (B) en la apoptosis y el crecimiento de las células WM366-4 de melanoma;

Ejemplo 2

Inhibición de la multiplicación de las células de melanoma mediante el dexamabinol

Métodos

Se estudió asimismo la capacidad del dexamabinol para inhibir la multiplicación de las células de melanoma en 3 estirpes celulares de melanoma (A375, UACC62, Malme-3M) utilizando el ensayo de la sulforodamina B (SRB).

Se prepararon soluciones estériles de las concentraciones finales de dexamabinol (0,001 µM a 100 µM en 0,5% de DMSO).

Las células se incubaron con concentraciones del fármaco en un 0,5% de DMSO (100 µl de volumen total por pocillo) a 37 °C en CO₂ al 5% durante 5 días. Los pocillos de control contenían células más DMSO al 5% más medio.

El ensayo de la inhibición de la multiplicación con SRB se realizó durante 24 días y 5 periodos de exposición. Tras la exposición, se fijaron las células, se tiñeron con SRB y se realizó la lectura en un lector de placas del sistema de espectrofotómetro de 250 microplacas SpectorMax®.

Resultados

El efecto de dexamabinol en la inhibición de la multiplicación en 3 estirpes celulares de melanoma tras 5 días de exposición se muestra en la figura 4. Se determinó asimismo la inhibición del crecimiento tras 24 horas de exposición. Los valores de la IM_{50} para ambos tiempos de exposición se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Efecto del tiempo de exposición en la capacidad del dexamabinol para inhibir la multiplicación de células de melanoma *in vitro*.

		A375	Malme-3M	UACC62
$IM_{50}(\mu M)^a$	5 días	16,2	13,3	18,5
		14,4	13,3	18,1
	24 horas	14,3		

^a Determinada mediante el ensayo de la inhibición de la multiplicación con SRB

Ejemplo 3

Efecto del dexamabinol en la evolución temporal de la multiplicación celular

Métodos

Se examinó el efecto de la evolución temporal del dexamabinol en la multiplicación celular en una estirpe celular de melanoma, la A375, utilizando el procedimiento del ensayo clonogénico.

Se recogieron las células A375 a partir de un cultivo celular en multiplicación y se procedió al recuento. Las células se diluyeron hasta $1,0 \times 10^5$ /ml y se sembraron 2 ml/pocillo en placas de 6 pocillos.

Las células se incubaron durante la noche a 37 °C, en una incubadora humidificada con aire al 95% + CO₂ al 5%.

Las células se trataron con dexamabinol en 4 dosis de hasta 20 μM en 3 períodos de exposición (1 hora, 6 horas y 24 horas).

Tras cada período de exposición, se recogieron las células de los pocillos lavando dos veces con PBS y añadiendo a continuación 0,2 ml de una dosis simple de tripsina a cada pocillo e incubando a 37 °C hasta que las células se separaron. Se contaron las suspensiones celulares en una dilución de 1/10 y a continuación se diluyeron hasta 1/10, 1/100, 1/1000. Se sembraron placas de 10 cm (que contenían 7 ml de medio fresco) con 3 densidades celulares distintas para el tratamiento con dexamabinol y el tratamiento de control. Cuando se formaron colonias con un tamaño adecuado en las placas control, se fijaron las placas, se tiñeron y se procedió al recuento.

El porcentaje de supervivencia de las células A375 tratadas con dexamabinol se calculó utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ De eficiencia de la clonación} = \frac{\text{Colonias contadas}}{\text{Células cultivadas}} \times 100$$

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{\text{Eficiencia de la clonación en las células tratadas con el fármaco}}{\text{Eficiencia de la clonación en las células de control}} \times 100$$

Resultados

El efecto de la evolución temporal del dexamabinol en la muerte celular en células de melanoma A375 se muestra en la figura 5.

Ejemplo 4

Inhibición de la multiplicación de las células de un xenoinjerto de melanoma humano mediante el dexamabinol

Métodos:

Una vez se ha determinado que el dexamabinol inhibe la multiplicación de células de melanoma *in vitro*, se intentó establecer a continuación si el compuesto era activo *in vivo*. Se realizó un estudio farmacocinético preliminar (PK) y de la dosis máxima tolerada (MTD) para determinar si los niveles de dosis terapéuticamente efectivos de

dexanabinol se podían alcanzar ratones CD1 con tumores A375. Los resultados demostraron que con la MTD (dosis única iv de 100 mg/kg) se alcanzó una concentración plasmática de 10 μ M durante 2 horas. Basándose en ello, se realizó un estudio de la eficacia de una dosis única.

- 5 Se diluyó dexanabinol en un vehículo de cremofor / etanol (1:1 v/v) al 10% en solución salina. A los ratones de control se les administró el vehículo solo.

10 A 10 ratones se administraron 100 mg/kg de dexanabinol por vía intravenosa. A 10 ratones se administró el vehículo (10 ml / kg). A los ratones se implantaron 1×10^7 células A375 de melanoma humano, en 50 μ l de medio, en el costado. Una vez que los tumores fueron palpables (aproximadamente de 5 mm x 5 mm) se trataron 20 ratones con dexanabinol o con el vehículo (tal como se describió anteriormente). Se observaron los ratones por lo menos una vez al día y se pesaron 3 veces a la semana. Se determinó el tamaño del tumor 3 veces a la semana tras el tratamiento. El tratamiento duró 4 semanas.

15 Resultados

La evolución temporal del crecimiento tumoral y un gráfico que resume la evolución hasta que los tumores alcanzan un volumen tumoral 4 veces superior al del día del tratamiento (período hasta RTV 4) se muestran en las figuras 6 y 7.

20 SUMARIO

25 Se analizó el dexanabinol contra diversas estirpes celulares establecidas de melanoma humano, comprendiendo algunas obtenidas a partir de metástasis de melanoma diseminadas en otros tejidos. Los ensayos de proliferación *in vitro* de las células demostraron que el dexanabinol es muy citotóxico para todas las estirpes celulares de melanoma humano estudiadas a unas concentraciones distribuidas alrededor de una media de 14 μ M. El dexanabinol provocó la muerte celular apoptótica de un modo que dependía de la caspasa 3/7.

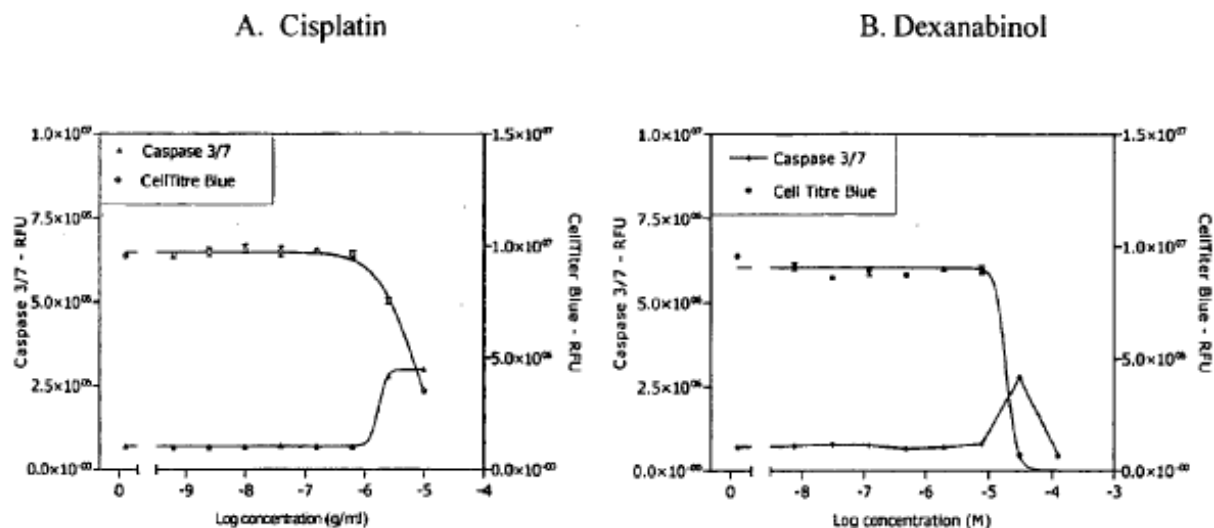
30 Dicho efecto era independiente del tiempo, y la muerte celular era de la misma magnitud después de 1 hora que después de 24 horas.

35 Los efectos antitumorales *in vitro* del dexanabinol se observaron a unas concentraciones del fármaco que se había demostrado que eran inocuas y clínicamente alcanzables en los pacientes (~10-20 μ M). El efecto de una dosis única de dexanabinol en el crecimiento de xenoinjertos de melanoma humano de células se estudió a continuación. La concentración plasmática mínima requerida, basándose en los resultados del ensayo de la multiplicación celular *in vitro*, (10 μ M se mantuvieron durante por lo menos 2 horas) se alcanzó administrando una sola dosis iv de dexanabinol a la MTD (100 mg/kg) en ratones lampiños CD1. La dosis única de dexanabinol ocasionó un efecto de retardo en la multiplicación en los ratones lampiños CD1 portadores del xenoinjerto tumoral humano A375.

REIVINDICACIONES

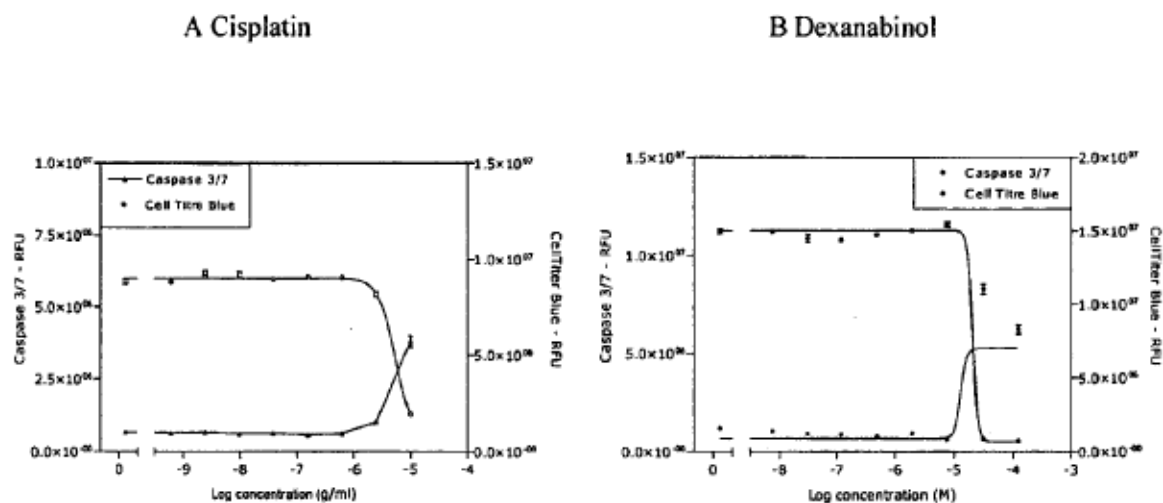
1. Dexanabinol, o una sal del mismo, para utilizar en el tratamiento del melanoma.
- 5 2. Dexanabinol para utilizar según la reivindicación 1, en el que las células cancerosas de melanoma son precancerosas, malignas, metastásicas o multirresistentes.
- 10 3. Dexanabinol para utilizar según la reivindicación 1, en el que el tratamiento del melanoma comprende independiente, simultánea o secuencialmente la inhibición de la actividad del NFkB de una célula cancerosa de melanoma.
- 15 4. Dexanabinol para utilizar según la reivindicación 1, en el que el tratamiento del melanoma comprende la inhibición de la oncogénesis de una célula cancerosa de melanoma.
- 20 5. Dexanabinol para utilizar según la reivindicación 4, en el que la inhibición de la oncogénesis comprende provocar tanto la citotoxicidad como la apoptosis en la célula cancerosa.
- 25 6. Dexanabinol para utilizar según la reivindicación 1, junto con un segundo agente terapéutico seleccionado de entre uno o más de un antineoplásico, un inmunoterápico, un agente de genoterapia o de radioterapia.
- 30 7. Uso del dexanabinol en la realización de un medicamento para el tratamiento y el alivio del melanoma.
- 35 8. Uso según la reivindicación 7, en el que las células cancerosas de melanoma son precancerosas, malignas, metastásicas o multirresistentes.
- 40 9. Uso según la reivindicación 7, en el que el tratamiento del melanoma comprende independiente, simultánea o secuencialmente la inhibición de la actividad del NFkB de una célula cancerosa de melanoma.
- 45 10. Uso según la reivindicación 7, en el que el tratamiento del melanoma comprende la inhibición de la oncogénesis de una célula cancerosa de melanoma.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que la inhibición de la oncogénesis comprende provocar tanto la citotoxicidad como la apoptosis en la célula cancerosa.
12. Uso según la reivindicación 7, que en la realización de una politerapia que comprende dexanabinol junto con uno o más agente(s) terapéutico(s) que comprende(n) un antineoplásico, un inmunoterápico, un agente de genoterapia o de radioterapia; independiente, simultánea o secuencialmente.
13. Uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento es para administración oral o intravenosa.
14. Composición farmacéutica que comprende dexanabinol, o una sal del mismo, y uno o más de un agente terapéutico que comprende un antineoplásico, un inmunoterápico, un agente de genoterapia o un agente de radioterapia; en mezcla con un aditivo, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables para utilizar en el tratamiento o el alivio del melanoma.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para utilizar según la reivindicación 14 apta para una administración tópica o intravenosa.

Figura 1: Efectos del cisplatino (A) y del dexamabinol (B) en la apoptosis y el crecimiento de las células A375 de melanoma;



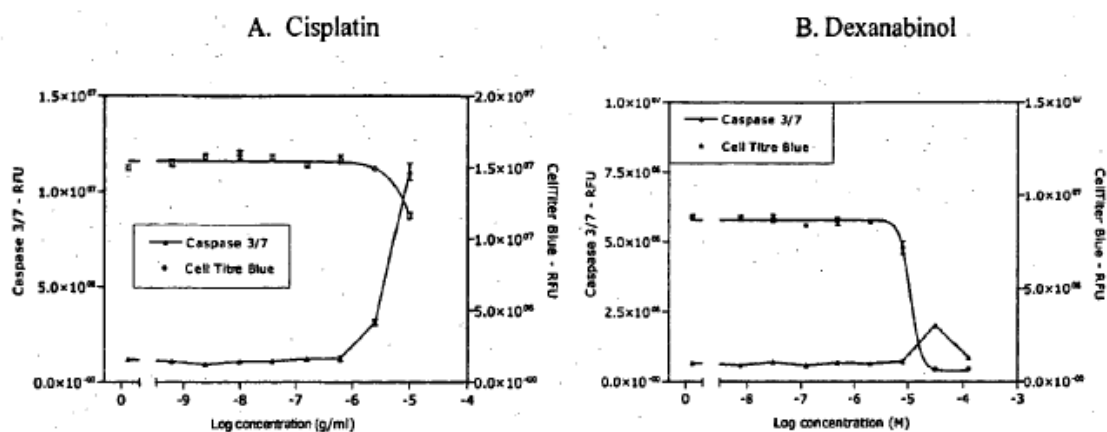
A. Cisplatino				B. Dexamabinol			
	Caspasa 3/7				Caspasa 3/7		
Caspasa 3/7 - RFU	CellTiter-Blue		CellTiter-Blue - RFU	Caspasa 3/7 - RFU	CellTiter-Blue		CellTiter-Blue - RFU
Concentración log (g/ml)				Concentración log (M)			

Figura 2: Efectos del cisplatino (A) y del dexamabinol (B) en la apoptosis y el crecimiento de las células G-361 de melanoma



A. Cisplatino				B. Dexamabinol			
	Caspasa 3/7				Caspasa 3/7		
Caspasa 3/7 - RFU	CellTiter-Blue		CellTiter-Blue - RFU	Caspasa 3/7 - RFU	CellTiter-Blue		CellTiter-Blue - RFU
Concentración log (g/ml)				Concentración log (M)			

Figura 3: Efectos del cisplatino (A) y del dexanabinol (B) en la apoptosis y el crecimiento de las células WM366-4 de melanoma



A. Cisplatino				B. Dexanabinol			
	Caspasa 3/7				Caspasa 3/7		
Caspasa 3/7 - RFU	CellTiter-Blue		CellTiter-Blue - RFU	Caspasa 3/7 - RFU	CellTiter-Blue		CellTiter-Blue - RFU
Concentración log (g/ml)				Concentración log (M)			

Figura 4: Efecto del dexamabinol (B) en la multiplicación de las estirpes celulares A375 (A), UACC62 (B) y Malme-3M (C) de melanoma (exposición de 5 días)

A A375: Inhibición de la multiplicación

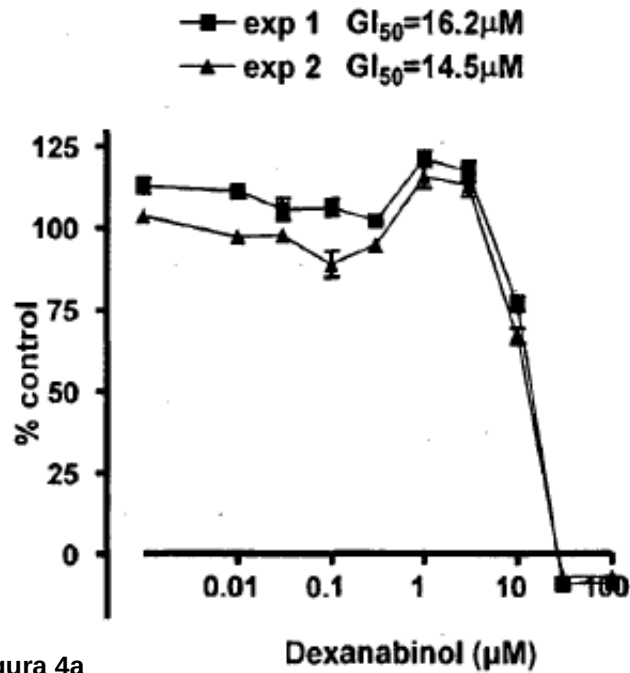


Figura 4a

B UACC62: Inhibición de la multiplicación

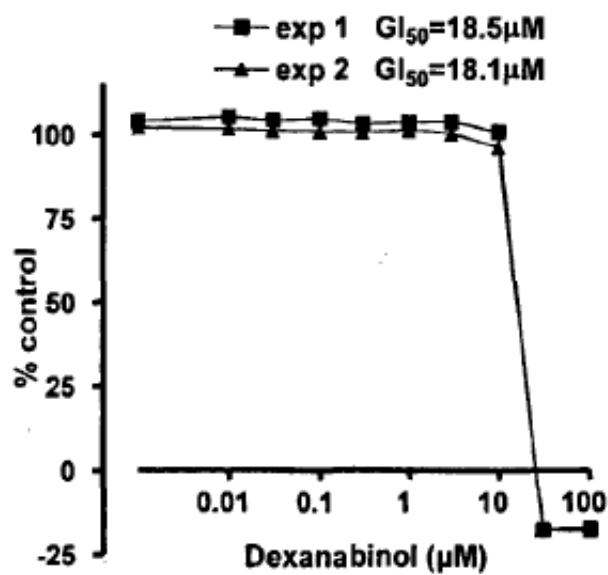


Figura 4b

C Malme-3M: Inhibición de la multiplicación

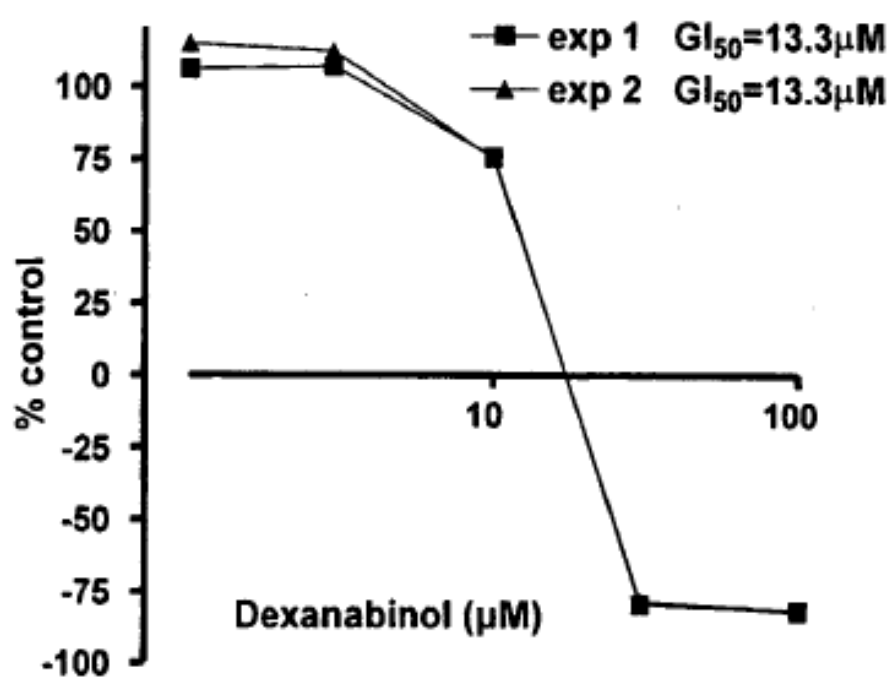


Figura 4c

Figura 5: Efecto del dexanabinol en la multiplicación de las células A375 de melanoma tras 1 hora, 6 horas y 24 horas de exposición)

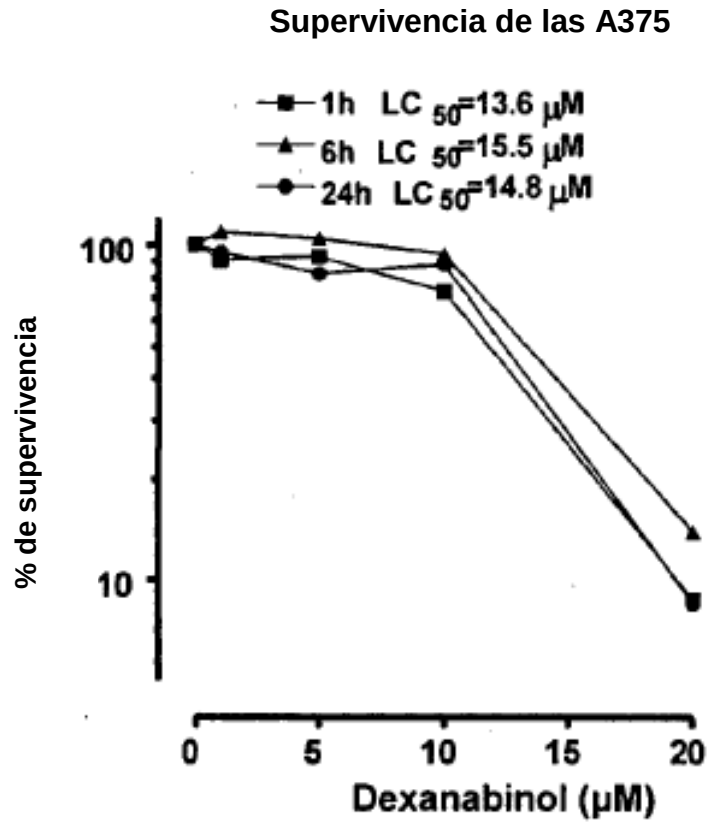


Figura 6: Evolución tumoral en ratones lampiños CD1 con A375 tratados con dexamabinol

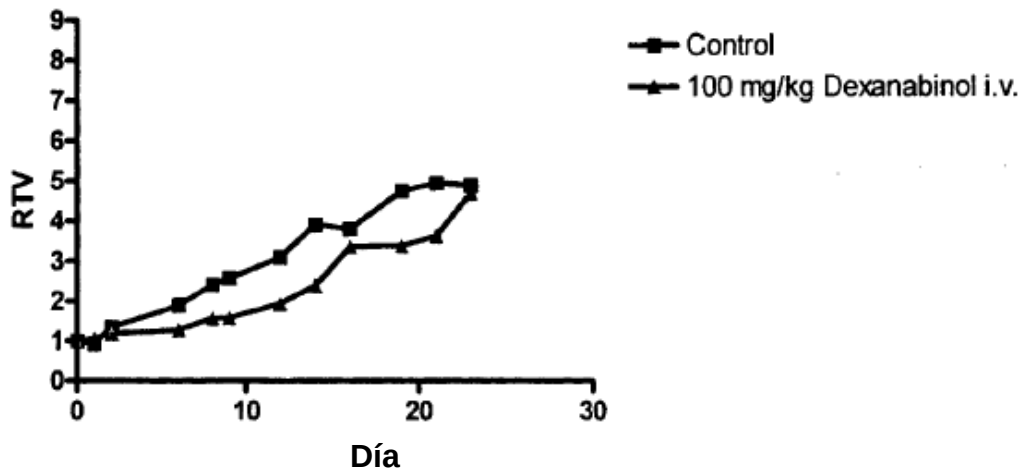
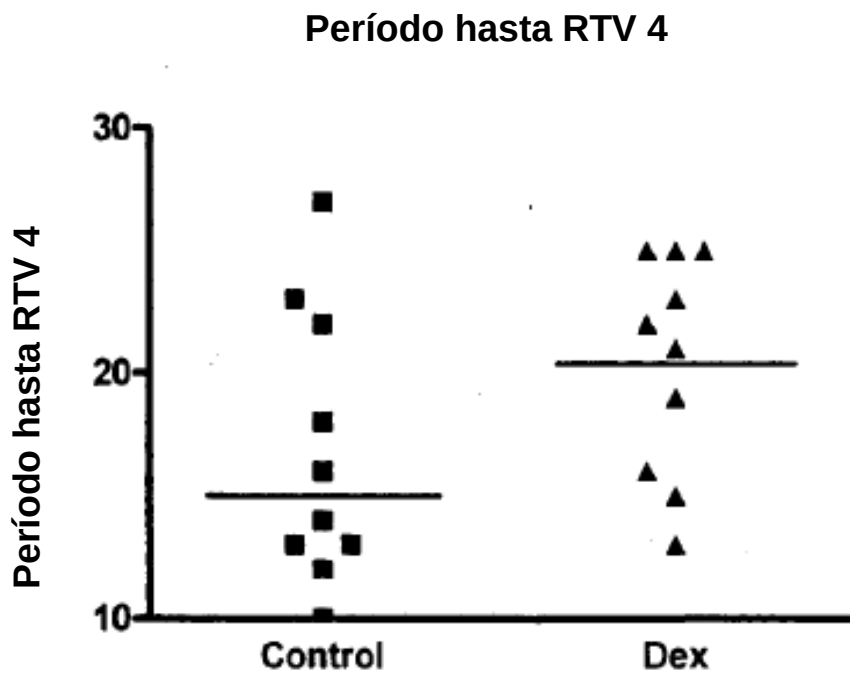


Figura 7: Gráfico que resume el período hasta RTV 4 en ratones lampiños CD1 con A375



La línea muestra el período hasta la media de RTV 4

Cada punto representa el período hasta RTV 4 para un ratón individual

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- | | |
|------------------------------|-----------------------|
| • US 20060025419 A [0006] | • US 3598122 A [0027] |
| • US 4876276 A [0007] [0020] | • US 4144317 A [0027] |
| • GB 2185187 A [0027] | • US 4262003 A [0027] |
| • US 3249109 A [0027] | • US 4307717 A [0027] |