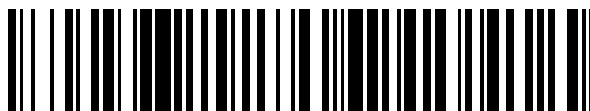


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 593**

51 Int. Cl.:

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2007 E 07763797 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2049121**

54 Título: **Composiciones para estimular la actividad de terapias anticáncer**

30 Prioridad:

03.08.2006 AU 2006904193

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

05.02.2014

73 Titular/es:

**ONCOLOGY RESEARCH INTERNATIONAL
LIMITED (100.0%)
6 256 ST. GEORGES TERRACE
PERTH, WA 6000, AU**

72 Inventor/es:

**STORY, MICHAEL JOHN y
WAYTE, KENNETH MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 593 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para estimular la actividad de terapias anticáncer

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional australiana n.º 2006904193, presentada el 3 de agosto, 2006.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para inhibir el crecimiento de células cancerosas, y para prevenir y tratar el cáncer, en las que las composiciones incluyen una saponina esteroidea seleccionada de deltonina, dioscina y prosapogenina A, y un agente anticáncer, según se menciona en la reivindicación 1.

Antecedentes de la invención

10 La quimioterapia y la terapia de radiación siguen siendo las principales estrategias para el tratamiento terapéutico del cáncer, y la cirugía proporciona el medio para extirpar físicamente el cáncer. En fechas más recientes, se han desarrollado agentes biológicos, tales como anticuerpos, como terapias anticáncer.

15 La aplicación de muchos agentes anticáncer y de la terapia de radiación se ha basado en la premisa de que la muerte celular provocada por el tratamiento con estas terapias anticáncer pondrá en juego procesos biológicos que den como resultado, en último término, la destrucción de las células cancerosas.

Uno de estos procesos es la apoptosis. La apoptosis es el complejo programa celular de autodestrucción, activado por una diversidad de estímulos que producen la autodestrucción, en la que las células moribundas se encogen, se condensan y después se fragmentan, liberando pequeños cuerpos apoptóticos unidos a membranas que normalmente son engullidos por otras células, tales como fagocitos.

20 Los agentes quimioterapéuticos convencionales se unen covalentemente con el ADN para formar aductos, dando como resultado con ello a daños en el ADN y activando la apoptosis. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales tienen dos desventajas principales: (i) provocan graves efectos secundarios, porque también afectan a las células en proliferación sanas; y (ii) aumentan la resistencia a los agentes por parte de las células cancerosas. A este respecto, las células cancerosas tienen la capacidad de desarrollar resistencia a los agentes quimioterapéuticos a lo largo del tiempo y, en último término, pueden desarrollar resistencia a múltiples fármacos.

25 La inhibición de la apoptosis en tumores resistentes a fármacos no solo afecta a las actividades inductoras de muerte del fármaco, sino que también abre la posibilidad de que las células adquieran otras mutaciones después de los daños en el ADN. En principio, estas células mutagenizadas pueden ser más malignas e incluso menos sensibles a posteriores terapias, de modo que el tratamiento de tumores muy resistentes que contienen lesiones antiapoptóticas puede hacer más daño que bien.

30 Una de las características de las células cancerosas es que eluden la apoptosis. La alteración de la vía apoptótica tiene importantes efectos sobre el resultado clínico de la quimioterapia. Para que los agentes quimioterapéuticos sean eficaces, las células deben ser capaces de sufrir apoptosis. Por tanto, la apoptosis es un fenómeno de vital importancia en la quimioterapia del cáncer, porque muchos fármacos anticáncer ejercen su efectos antitumoral inicial contra las células cancerosas induciendo la apoptosis.

35 Sin embargo, no solo algunos fármacos quimioterapéuticos pueden inhibir la apoptosis después de un corto periodo de tiempo, sino que muchos tumores también tiene vías apoptóticas defectuosas y, así, son inherentemente más resistentes a la quimioterapia. Además, aunque la tasa de apoptosis no es necesariamente alta en tejidos tumorales, la inducción de la apoptosis se correlaciona con la respuesta tumoral y el resultado clínico en pacientes con cáncer.

40 Uno de los principales obstáculos para el tratamiento de muchos tipos de cáncer es el desarrollo o la presencia de resistencia a agentes quimioterapéuticos, tal como sucede en el cáncer de pulmón no microcítico. Por ejemplo, el desarrollo de resistencia al cisplatino es una causa principal de fallo del tratamiento. Se han implicado varios mecanismos en la resistencia al cisplatino, uno de los cuales es la expresión alterada de oncogenes (por ejemplo, Bcl-2) que posteriormente suprimen las vías apoptóticas y que también pueden contribuir al desarrollo de resistencia.

45 Rong-Tsun Wu et al., 1990, revisan las actividades inmunomoduladoras y antitumorales de la formosantina-C. Se describe el uso concomitante con 5-fluorouracilo. La actividad del 5-Fu fue potenciada por el uso concomitante de asperina.

50 Por consiguiente, son necesarios agentes que puedan utilizarse junto con terapias anticáncer para potenciar su actividad contra células cancerosas. La presente invención se refiere al uso de saponinas esteroideas para estimular la actividad de agentes anticáncer y tratamientos anticáncer.

La referencia en la presente a un documento de patente u otro tema que se indique como técnica anterior no debe

considerarse una admisión de que el documento o tema es conocido o que la información que contiene es parte del conocimiento general común tal como se encuentra en la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención surge de los estudios sobre la capacidad de las saponinas esteroideas para inhibir el crecimiento de células cancerosas. En particular, se ha descubierto que las saponinas esteroideas potencian la actividad de una serie de agentes quimioterapéuticos y anticáncer para inhibir el crecimiento de células cancerosas.
- Aunque no se pretende limitación alguna por la teoría, es probable que la capacidad de las saponinas esteroideas para potenciar la actividad anticáncer de estos agentes sea debida a la capacidad de las saponinas esteroideas para estimular la apoptosis en las células cancerosas cuando se emplean con la terapia anticáncer. Un mecanismo para la capacidad de las saponinas esteroideas para estimular la apoptosis puede ser debido a la capacidad de las saponinas esteroideas para dirigirse o inhibir moléculas que, por lo demás, reprimen la apoptosis en células cancerosas.
- 10 Así, la presente invención puede utilizarse para estimular la actividad de agentes anticáncer (tales como agentes quimioterapéuticos) y para estimular la actividad de tratamientos anticáncer (tales como radioterapia).
- 15 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer, según se describe en la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto.
- La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para estimular la actividad de una terapia anticáncer en un sujeto, según se especifica en la reivindicación 1.
- 20 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para inhibir la formación y/o el crecimiento de un tumor en un sujeto, según se especifica en la reivindicación 1.
- 25 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto, según se especifica en la reivindicación 1.
- La presente invención también proporciona un producto de combinación, que incluye:
- una saponina esteroidea; y
- un agente anticáncer;
- 30 proporcionándose la saponina esteroidea y el agente anticáncer en una forma para la coadministración a un sujeto, o en una forma para la administración separada a un sujeto, en el que la saponina esteroidea y el agente anticáncer son según la reivindicación 1.
- La presente invención también proporciona una composición anticáncer, incluyendo dicha composición un agente anticáncer y una saponina esteroidea, según la reivindicación 2.
- 35 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para reducir la cantidad de una terapia anticáncer proporcionada a un sujeto para prevenir y/o tratar un cáncer, en el que la saponina esteroidea y el agente anticáncer son según la reivindicación 1.
- La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto que tiene una mayor resistencia a una terapia anticáncer, en el que la saponina esteroidea y el agente anticáncer son como se lista en la reivindicación 1 o 2.
- 40 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para reducir el desarrollo de resistencia en una célula cancerosa frente a una terapia anticáncer, en el que la saponina esteroidea y el agente anticáncer son como se lista en la reivindicación 1 o 2.
- 45 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para estimular la apoptosis de una célula cancerosa debida a la exposición de la célula cancerosa a una terapia anticáncer, en el que la saponina esteroidea y el agente anticáncer son como se lista en la reivindicación 1 o 2.
- 50 Los diversos términos y expresiones que se emplean a lo largo de la memoria descriptiva tienen el significado que es bien entendido por los expertos en la técnica. Sin embargo, para facilitar su referencia, a continuación se definen algunos de estos términos y expresiones.

- 5 Debe entenderse que el término "glicósido", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa un compuesto que contiene un resto sacárido (azúcar) (monosacárido, disacárido o polisacárido), unido a un componente (no sacárido) de aglicona esteroidea o alcaloide esteroidea o de triterpeno. En la mayoría de las circunstancias, el resto sacárido (azúcar) está unido a la posición C-3 de la aglicona, aunque se contemplan otros enlaces dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los glicósidos de furostanol, que contienen un sacárido unido a la posición C-26, y los glicósidos de espirostanol son ambos subclases de las saponinas esteroideas.
- 10 Debe entenderse que el término "saponina", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa un glicósido que incluye un sacárido (azúcar) unido a la aglicona, en general a través de la posición C-3 de la aglicona.
- 15 Debe entenderse que la expresión "saponina esteroidea", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa un glicósido que incluye una o más unidades de sacárido (que incluye una o más unidades de monosacárido, disacárido o polisacárido) unidas a una aglicona que no contiene un átomo de nitrógeno.
- A este respecto, debe entenderse que la expresión "saponina esteroidea" incluye dentro de su alcance cualquier sal o cualquier otro derivado de los compuestos que sea funcionalmente equivalente en términos de su capacidad para potenciar la actividad de una terapia anticáncer.
- Una "aglicona" esteroidea también se denomina "genina" o "sapogenina", y los términos pueden utilizarse de modo intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva y se entiende que todos significan la porción no sacárida de una molécula de saponina.
- 20 Debe entenderse que la expresión "sacárido A-(1→n)-sacárido B", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa un sacárido A que está unido a través de su C-1 al C-n del sacárido B, siendo n un número entero.
- Por ejemplo, el polisacárido con el nombre común "chacotriosa" es un α -L-ramnopiranosil-(1→2)-[α -L-ramnopiranosil-(1→4)]- β -D-glucopiranosido. Una forma abreviada de nomenclatura según las recomendaciones de la IUPAC empleada en la presente es Rha 2, [Rha 4], Glc.
- 25 Debe entenderse que la expresión "terapia anticáncer", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa un agente anticáncer, tal como un agente quimioterapéutico (por ejemplo, cisplatino) o un agente biológico (por ejemplo, un anticuerpo) o un tratamiento canticáncer, tal como radioterapia.
- 30 Debe entenderse que el término "sujeto", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa cualquier sujeto humano o animal. A este respecto, debe entenderse que la presente invención incluye dentro de su alcance las aplicaciones veterinarias. Por ejemplo, el sujeto animal puede ser un mamífero, un primate, un animal de ganadería (por ejemplo, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo o una cabra), un animal de compañía (por ejemplo, un perro, un gato), un animal de ensayo de laboratorio (por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, un ave), un animal de importancia veterinaria, o un animal de importancia económica.
- 35 Debe entenderse que el término "tratar" y sus variaciones, tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa una intervención terapéutica con una cantidad eficaz de una saponina esteroidea. Por ejemplo, el término incluye dentro de su alcance una intervención terapéutica que produce uno o más de los siguientes resultados: (i) inhibir o prevenir el crecimiento de un tumor primario en un sujeto, que incluye reducir el crecimiento del tumor primario después de su resección; (ii) inhibir o prevenir el crecimiento y la formación de uno o más tumores secundarios en un sujeto; (iii) mejorar la esperanza de vida del sujeto, comparado con el estado no tratado; y (iv) mejorar la calidad de vida del sujeto, comparado con el estado no tratado.
- 40 Debe entenderse que el término "inhibir", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa una reducción en el avance de un proceso, que incluye uno cualquiera o más del inicio, la velocidad, la probabilidad, la continuación o la terminación de un proceso.
- 45 Debe entenderse que la expresión "célula cancerosa", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva con relación a células, significa una célula que está inmortalizada y cuyo crecimiento no es inhibido por contacto por otras células. Una célula cancerosa también puede no mostrar dependencia de factores del crecimiento exógenos y/o del crecimiento dependiente del anclaje.
- 50 Debe entenderse que la expresión "sistema biológico", tal como se emplea a lo largo de la memoria descriptiva, significa cualquier sistema multicelular, e incluye de grupos aislados de células a organismos completos. Por ejemplo, el sistema biológico puede ser células en cultivo de tejidos, un tejido o un órgano, o un sujeto humano completo que padece los efectos del crecimiento no deseado o incontrolado de células cancerosas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el efecto de la deltonina sobre el volumen tumoral en combinación con 5-fluorouracilo en células de carcinoma de próstata humanas HT29 introducidas por vía subcutánea en ratones.

Descripción general de la invención

- 5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertas saponinas esteroideas tienen la capacidad para estimular la actividad de ciertas terapias anticáncer. Así, una saponina esteroide puede utilizarse en combinación con una terapia anticáncer para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, en el que las saponinas esteroideas y los fármacos anticáncer son los que mencionan en la reivindicación 1 o 2.
- La célula cancerosa, en las diversas realizaciones de la presente invención, puede ser una célula humana o animal.
- La célula cancerosa puede ser una célula cancerosa presente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la célula cancerosa puede ser una célula cancerosa presente en un cultivo celular *in vitro*.
- 10 En el caso de una célula *in vitro*, la célula cancerosa puede ser una célula primaria, tal como una célula cancerosa aislada o derivada de un tumor en un sujeto. Como alternativa, la célula cancerosa puede ser una célula derivada de una línea de células cancerosas. Los ejemplos de líneas de células cancerosas incluyen melanoma humano, adenocarcinoma de colon (WiDr), carcinoma mamario (MCF7), linfoma de células T de ratón (WEHI-7), fibrosarcoma de ratón (WEHI-164/IC), SKMel28 (melanoma), HT29 (colon), C180-13S (ovario), A549 (pulmón), DU145 (próstata - independiente de hormonas), PC3 (próstata - independiente de hormonas), LNCap (próstata - dependiente de hormonas), K562 (eritroleucemia humana) y MM96L (melanoma).
- 15 La célula cancerosa en las diversas formas de la presente invención también puede ser una célula presente en un sistema biológico, tal como una célula cancerosa presente *in vivo*, que incluye una célula cancerosa que esté asociada con un tumor primario y/o uno o más tumores secundarios en un sujeto.
- 20 A este respecto, debe entenderse que la expresión "sistema biológico" significa cualquier sistema multicelular, e incluye de grupos aislados de células a organismos completos. Por ejemplo, el sistema biológico puede ser un tejido o un órgano, o un sujeto humano completo, que incluye un sujeto con cáncer.
- En el caso de una célula cancerosa presente en un sujeto, la célula cancerosa puede estar asociada, por ejemplo, con uno o más de los siguientes cánceres: carcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, que incluye cáncer de colon, recto, ano y apéndice, cáncer de esófago, enfermedad de Hodgkin, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, lunares y nevi displásicos, mieloma múltiple, cáncer muscular, linfoma no hodgkiniano, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, teratoma, cáncer de tiroide, y cáncer de útero.
- 25 En una realización, la terapia anticáncer es la exposición de la célula cancerosa a un agente anticáncer, tal como un agente quimioterapéutico o un agente biológico, tal como se menciona en las reivindicaciones 1 y 2.
- 30 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto, según la reivindicación 1.
- 35 Tal como se analizó anteriormente, la presente invención puede utilizarse para estimular la actividad de una terapia anticáncer en un sujeto, exponiendo el sujeto a una saponina esteroidea.
- Una saponina esteroidea también puede utilizarse para la preparación de un medicamento para estimular la actividad de un agente anticáncer, siendo la saponina esteroidea y el agente anticáncer los listados en las reivindicaciones 1 y 2.
- 40 Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para estimular la actividad de un agente anticáncer en un sujeto, según se especifica en la reivindicación 1.
- La presente invención también puede utilizarse para inhibir la formación y/o el crecimiento de un tumor en un sujeto.
- También puede utilizarse una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para inhibir la formación y/o el crecimiento de un tumor en un sujeto, según la reivindicación 1.
- 45 Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento y/o la formación de un tumor en un sujeto, según la reivindicación 1.
- 50 El tumor, en las diversas realizaciones de la presente invención, puede ser un tumor primario o un tumor secundario. Así, la presente invención también puede utilizarse para inhibir la formación y el crecimiento de un tumor primario y/o puede utilizarse para inhibir la formación y/o el crecimiento de metástasis en el sujeto.
- Los métodos para evaluar la formación y/o el crecimiento de tumores son conocidos en la técnica.

La presente invención también puede utilizarse para prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto.

También puede utilizarse una saponina esteroidea y un agente anticáncer según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto.

5 Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto, según la reivindicación 1.

El sujeto, en las diversas realizaciones de la presente invención, puede ser un ser humano o un sujeto animal.

10 Por ejemplo, el sujeto animal puede ser un mamífero, un primate, un animal de ganadería (por ejemplo, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo o una cabra), un animal de compañía (por ejemplo, un perro, un gato), un animal de ensayo de laboratorio (por ejemplo, un ratón, un rata, una cobaya, un ave), un animal de importancia veterinaria, o un animal de importancia económica.

En una realización, el sujeto es un sujeto humano.

15 La inhibición del crecimiento de la célula cancerosa en las diversas realizaciones de la presente invención es cualquier forma de inhibición de la proliferación de la célula. Por ejemplo, la inhibición de la proliferación puede implicar inhibir la capacidad de una célula para comenzar a proliferar, continuar proliferando, o reducir la probabilidad de que una célula concreta comience o continúe proliferando.

La inhibición del crecimiento de una célula cancerosa en las diversas realizaciones de la presente invención puede evaluarse mediante métodos conocidos en la técnica.

20 Por ejemplo, para una célula cancerosa *in vitro*, el crecimiento de la célula cancerosa puede ser determinado mediante un ensayo de proliferación adecuado, o mediante un método para evaluar el grado de incorporación de timidina tritiada en el ADN celular a lo largo de un periodo de tiempo dado.

Para una célula cancerosa presente *in vivo*, el crecimiento de la célula cancerosa puede determinarse, por ejemplo, mediante un método de formación de imágenes adecuado conocido en la técnica.

25 Tal como se analizó previamente en la presente, la terapia anticáncer puede ser la exposición a un agente anticáncer y/o la exposición a un tratamiento anticáncer.

En una realización, el agente anticáncer según la reivindicación 1 o 2 es un agente que estimula la apoptosis en una célula tras la exposición del agente a la célula. Los métodos para determinar la capacidad de un agente para estimular la apoptosis son conocidos en la técnica.

30 En una realización específica, el agente anticáncer según la reivindicación 1 o 2 inhibe la actividad de un inhibidor de la apoptosis en la célula cancerosa, tal como uno o más de survivina, XIAP, Bcl-2 o Bcl-XL.

El agente anticáncer según la reivindicación 1 o 2 se selecciona de taxol (paclitaxel), docetaxel, el inhibidor de topoisomerasa doxorubicina, el agente dirigido a los procesos celulares imatinib, y 5-fluorouracilo.

35 Los detalles de las vías de administración, las dosis y los regímenes de tratamiento de agentes anticáncer son conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en "Cancer Clinical Pharmacology" (2005), ed. por Jan H.M. Schellens, Howard L. McLeod y David R. Newell, Oxford University Press.

40 Las saponinas se dividen, de modo convencional, en tres clases principales: (i) glicósidos de triterpeno; (ii) glicósidos esteroideos; y (iii) glicósidos alcaloides esteroideos. Todas tienen en común la unión de una o más unidades de azúcares a la aglicona, en general en la posición C-3. Las saponinas esteroideas se describen, de modo general, en Hostettmann K. y Marston A. (2005), Chemistry & pharmacology of natural products: Saponins, Cambridge University Press.

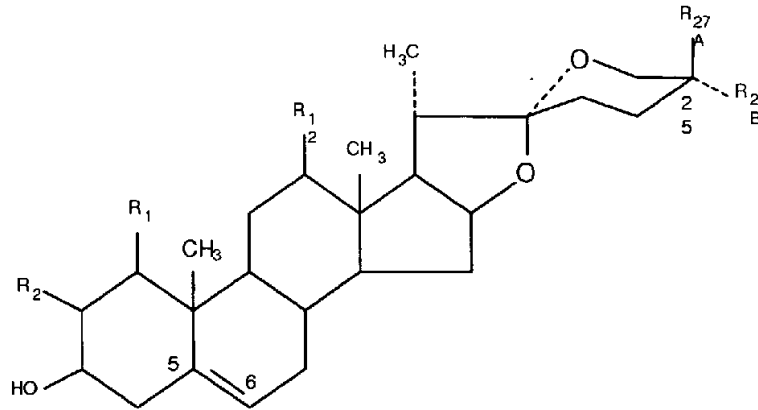
Tal como se analizó previamente en la presente, las saponinas esteroideas no contienen un átomo de nitrógeno en el resto de aglicona. Las saponinas esteroideas según la reivindicación 1 o 2 son deltonina, dioscina y prosapogenina A.

45 Se apreciará que la saponina esteroidea según la reivindicación 1 o 2, en las diversas realizaciones de la presente invención, incluye saponinas esteroideas naturales y saponinas esteroideas no naturales (es decir, saponinas esteroideas sintetizadas de modo químico).

La saponina esteroidea de chacotriósido "dioscina" consiste en la sapogenina "diosgenina" unida a través de la posición C-3 a chacotriosa.

50 La saponina esteroidea de solatriósido deltonina es diosgenina unida a través de la posición C-3 al solatriósido Rha 2, [Glc 4], Glc.

Los glicósidos de diosgenina procedentes de especies de *Dioscorea* tienen un gran interés comercial como materiales de partida para hormonas esteroideas. Los glicósidos de diosgenina y su isómero C-25 yamogenina están entre las saponinas de espirostanol más frecuentemente documentadas. Los ejemplos de saponinas de espirostanol naturales con un doble enlace C-5,C-6 en el anillo B se listan en la tabla 1.



5

Tabla 1

	R ₁	R ₂	R ₁₂	R _{27A}	R _{27B}
Diosgenina	H	H	H	H	CH ₃
Yamogenina	H	H	H	CH ₃	H
Yucagenina	H	OH	H	H	CH ₃
Gentrogenina	H	H	=O	H	CH ₃
Ruscogenina	OH	H	H	H	CH ₃

Los ejemplos de saponinas de espirostanol esteroideas naturales con un enlace sencillo C-5,C-6 en el anillo B se listan en la tabla 2.

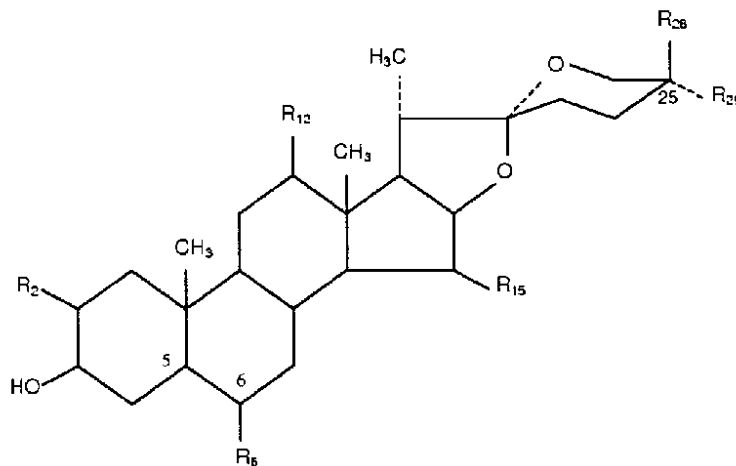


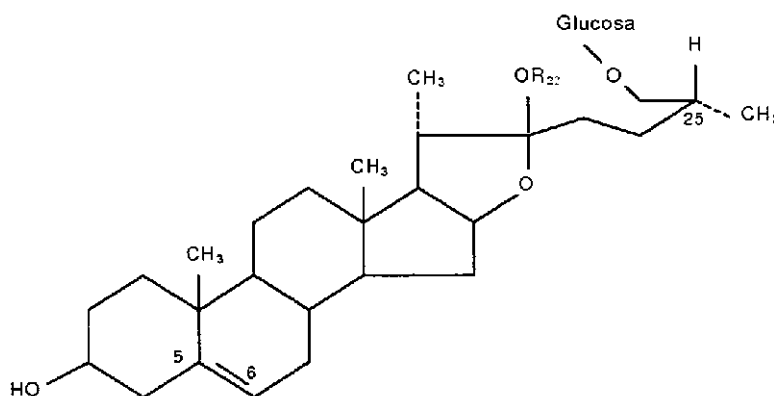
Tabla 2

	R ₂	H ₅	R ₆	R ₁₂	R ₁₅	R ₂₈	R ₂₉
Smilagenina	H	β	H	H	H	H	CH ₃
Tigogenina	H	α	H	H	H	H	CH ₃

	R ₂	H ₅	R ₆	R ₁₂	R ₁₅	R ₂₈	R ₂₉
Sarsasapogenina	H	β	H	H	H	CH ₃	H
Gitogenina	OH	β	H	H	H	H	CH ₃
Hecogenina	H	α	H	=O	H	H	CH ₃
Clorogenina	H	α	OH(α)	H	H	H	CH ₃
Digitogenina	OH(α)	α	H	H	OH(β)	H	CH ₃
Digalogenina	H	α	H	H	OH(β)	H	CH ₃

Los ejemplos de sapogeninas de furostanol esteroides naturales de tipo protoespirostanos con un doble enlace C-5,C-6 en el anillo B y un enlace sencillo C-30,C-22 en el anillo E se listan en la tabla 3.

Tabla 3



	R ₂₂
Protodiosgenina	H
Metilprotodiosgenina	CH ₃

5

En una realización, la saponina esteroidea es dioscina, en la que la dioscina es la sapogenina diosgenina unida a través de la posición C-3 a chacotriosa (Rha 2, [Rha 4], Glc).

La saponina esteroidea según la presente invención se selecciona del grupo que consiste en deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc), y prosapogenina A (diosgenina Rha2, Glc).

10 En el caso de la deltonina y la prosapogenina A, cualquiera de estas saponinas esteroideas pueden prepararse en una composición farmacéutica.

Por consiguiente, dichas saponinas esteroideas pueden utilizarse para la preparación de un medicamento.

15 Dicho medicamento puede utilizarse para uno o más de la inhibición del crecimiento de una célula cancerosa; la inhibición de la formación y/o el crecimiento de un tumor; la prevención y/o el tratamiento de un cáncer, que incluye un cáncer que tiene mayor resistencia a una terapia anticáncer; la estimulación de la actividad de una terapia anticáncer; la reducción de la cantidad de una terapia anticáncer proporcionada a un sujeto; la estimulación de la apoptosis de una célula cancerosa debido a la exposición de la célula a una terapia anticáncer; la reducción de la resistencia que se desarrolla en una célula cancerosa frente a una terapia anticáncer.

20 Tal como se analizó previamente en la presente, la saponina esteroidea en las diversas realizaciones de la presente invención puede obtenerse a partir de fuentes naturales, puede prepararse a partir de procesos sintéticos, o como síntesis parcial o modificación aplicada a compuestos o intermedios naturales.

La extracción, el aislamiento y la identificación de las saponinas esteroideas en las diversas realizaciones de la

presente invención puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, algunas saponinas esteroideas pueden producirse a partir de fuentes vegetales. Otras fuentes de saponinas esteroideas pueden obtenerse con facilidad a partir de la bibliografía, por ejemplo, según se describe en Hostettmann K. y Marston A. (2005), *Chemistry & pharmacology of natural products: Saponins*, Cambridge University Press, capítulos 1-3 y 6. Los nombres comunes de las saponinas esteroideas se han utilizado según el texto anterior y the *Dictionary of Natural Products*, Chapman and Hall, CRC, (2004).

En la técnica se conocen maneras para exponer células cancerosas *in vitro* e *in vivo* a agentes anticáncer y tratamientos anticáncer.

En la técnica se conocen maneras para exponer una saponina esteroidea a una célula cancerosa *in vitro* e *in vivo*.

10 Una manera adecuada para exponer una saponina esteroidea a una célula cancerosa *in vitro* es mediante la exposición directa de la saponina esteroidea a la célula cancerosa.

En el caso de una célula cancerosa en un sujeto, una manera adecuada para exponer una célula cancerosa a una saponina esteroidea es mediante la administración de la saponina al sujeto.

15 Las cantidades eficaces de agentes anticáncer y los niveles eficaces de tratamientos anticáncer son conocidos en la técnica. Las maneras para exponer células cancerosas *in vitro* e *in vivo* a agentes y tratamientos anticáncer son conocidas en la técnica.

La cantidad eficaz de la saponina esteroidea que se va a exponer a la célula cancerosa en las diversas realizaciones de la presente invención no está particularmente limitada. En general, una concentración eficaz de la saponina esteroidea estará en el intervalo de 0,1 μM a 20 μM .

20 En el caso del uso de una saponina esteroidea para potenciar la actividad de un agente anticáncer en un sujeto, la saponina esteroidea y el agente anticáncer pueden administrarse por separado al sujeto en una forma adecuada o, como alternativa, se coadministran al sujeto en una forma adecuada.

Por ejemplo, la saponina esteroidea y el agente anticáncer pueden estar incluidos en un producto de combinación para la administración separada o la coadministración a un sujeto.

25 Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona un producto de combinación que incluye una saponina esteroidea y un agente anticáncer, proporcionándose la saponina esteroidea y el agente anticáncer en una forma para la coadministración a un sujeto, o en una forma para la administración separada a un sujeto.

El producto de combinación es adecuado, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de células cancerosas, para inhibir la formación y el crecimiento de tumores (tumores primarios y/o secundarios), y para prevenir y/o tratar un cáncer.

30 Los componentes del producto de combinación pueden envasarse por separado o juntos en recipientes esterilizados de modo adecuado, tales como ampollas, botellas o viales, en formas de múltiples dosis o en formas de dosificación unitaria. Generalmente, los recipientes están herméticamente sellados. En la técnica se conocen métodos para el envasado de los componentes.

35 Tal como se analizó previamente en la presente, la coadministración de la saponina esteroidea y un agente anticáncer puede ser secuencial o simultánea y, en general, significa que los agentes están presentes en el sujeto durante un intervalo de tiempo especificado. Generalmente, si un segundo agente se administra dentro de la semivida del primer agente, se considera que los dos agentes son coadministrados.

40 Los expertos en la técnica pueden elegir un régimen de dosificación apropiado para la administración de la saponina esteroidea. Por ejemplo, la administración de la saponina esteroidea al sujeto puede ser anterior, al mismo tiempo o después de la exposición del sujeto a la terapia anticáncer.

En una realización, la saponina esteroidea se administra a un sujeto al mismo tiempo que la administración de un agente anticáncer a un sujeto, o al mismo tiempo que la exposición del sujeto a un tratamiento anticáncer.

En una realización específica, la saponina esteroidea y el agente anticáncer pueden estar incluidos en una única composición para la administración a un sujeto.

45 Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye una saponina esteroidea y un agente anticáncer según la reivindicación 2.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona una composición anticáncer que incluye una un agente anticáncer y una saponina esteroidea según la reivindicación 2.

La composición puede utilizarse, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa *in vitro* o *in vivo*.

La composición también puede utilizarse para inhibir la formación y el crecimiento de tumores (tumores primarios y/o secundarios), y para prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto.

5 La cantidad eficaz de la saponina esteroidea y la cantidad eficaz de un agente anticáncer o un tratamiento anticáncer que se va a administrar al sujeto no están particularmente limitadas, con la condición de que estén dentro de dicha cantidad y estén en una forma que muestre, en general, un efecto útil o terapéutico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que necesita tratamiento, mejora la prognosis y/o el estado de salud del sujeto. La cantidad que se va a administrar a un sujeto dependerá de las características concretas de una o más de las células cancerosas cuyo crecimiento se va a inhibir, el cáncer que se está tratando, la vía de administración, y las características del sujeto, tales como la salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo y peso corporal. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

15 A este respecto, los detalles de las vías de administración, dosis y regímenes de tratamiento de agentes anticáncer y tratamientos de radioterapia son conocidos en la técnica, según se describe, por ejemplo, en "Cancer Clinical Pharmacology" (2005), ed. por J.H.M. Schellens, H.L. McLeod y D.R. Newell, Oxford University Press; y "Cancer and its management" (2005), 5ª edición, por R. Souhami y J. Tobias, Blackwell Publishing.

20 Tal como se analizó previamente en la presente, la administración y el transporte de las composiciones según la presente invención puede realizarse, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral o tópica, o mediante inyección directa en el sitio de un tumor primario antes, durante o después de otras formas de tratamiento, que incluyen cirugía. El modo y la vía de administración, en la mayoría de los casos, dependerá del tipo de tumor que se está tratando.

La frecuencia de la forma de dosificación y la cantidad de la dosis dependerá del modo y la vía de administración. Generalmente, una composición inyectable se administrará en una cantidad entre 5 mg/m² y 500 mg/m², en general entre 10 mg/m² y 200 mg/m². Generalmente, una composición administrada por vía oral se administrará en una cantidad de entre 5 mg y 5 g, preferiblemente entre 50 mg y 1 g.

25 Por ejemplo, las cantidades eficaces de la saponina esteroidea generalmente varían entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal diarios a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal diarios, y en una forma entre 1 mg/kg de peso corporal diario y 100 mg/kg de peso corporal diarios.

30 Tal como se describió anteriormente, la administración de una composición que incluye una saponina esteroidea también puede incluir el uso de uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables, aminoácidos, polipéptidos, polímeros, disolventes, tampones, excipientes, conservantes y agentes de relleno, tomando en consideración las características físicas, microbiológicas y químicas concretas de las saponinas esteroideas que se van a administrar.

35 Por ejemplo, la saponina esteroidea puede prepararse en una diversidad de composiciones farmacéuticamente aceptables en forma, por ejemplo, de una disolución acuosa, una preparación oleosa, una emulsión grasa, una emulsión, un polvo liofilizado para la reconstitución, etc., y puede administrarse como una inyección intramuscular o subcutánea estéril y apirógena, o como una inyección a un órgano, o como una preparación incrustada o como una preparación transmucósica a través de la cavidad nasal, el recto, el útero, la vagina, el pulmón, etc. La composición puede administrarse en forma de preparaciones orales (por ejemplo, preparaciones sólidas, tales como comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas, gránulos o polvos; preparaciones líquidas, tales como un jarabe, emulsiones, dispersiones o suspensiones).

Las composiciones que contienen la saponina esteroidea también pueden contener uno o más conservantes, agentes tamponantes, diluyentes, estabilizantes, agentes quelantes, agentes potenciadores de la viscosidad, agentes dispersantes, controladores del pH o agentes isotónicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes son muy conocidos por los expertos en la técnica.

45 Los ejemplos de conservantes adecuados son los ésteres de ácido benzoico del ácido para-hidroxibenzoico, fenoles, alcohol feniletílico o alcohol bencílico. Los ejemplos de tampones adecuados son sales de fosfato de sodio, ácido cítrico, ácido tartárico y similares. Los ejemplos de estabilizantes adecuados son antioxidantes, tales como acetato de alfa-tocoferol, alfa-tioglicerina, metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, acetilcisteína, 8-hidroxiquinoleína, y agentes quelantes, tales como edetato de disodio. Los ejemplos de agentes potenciadores de la viscosidad, agentes suspensores, solubilizantes o dispersantes adecuados son éteres de celulosa sustituida, ésteres de celulosa sustituida, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polietilenglicoles, carbómero, polioxipropilenglicoles, monooleato de sorbitano, sesquioleato de sorbitano, polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado 60.

Los ejemplos de controladores del pH adecuados incluyen ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, tampones y similares. Los ejemplos de agentes isotónicos adecuados son glucosa, D-sorbitol o D-manitol, cloruro de sodio.

55 La administración de la saponina esteroidea en las diversas realizaciones de la presente invención también puede ser en forma de una composición que contenga un vehículo, diluyente, excipiente, agente suspensor, agente

lubricante, adyuvante, vehículo, sistema de transporte, emulgente, disgregante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, deslizante, antiadherente, ligante, aromatizante o edulcorante farmacéuticamente aceptable, tomando en consideración las propiedades físicas, microbiológicas y químicas de las saponinas esteroideas que se van a administrar.

5 Para estos fines, la composición puede administrarse, por ejemplo, por vía oral, parenteral, mediante un pulverizado para la inhalación, adsorción, absorción, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, intraventricular, a través de un depósito implantado en formulaciones de dosificación que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, o mediante cualquier otra forma de dosificación conveniente. El término parenteral, tal como se emplea en la presente, incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal e intracraneal o técnicas de infusión.

10 Cuando se administra por vía parenteral, la composición normalmente estará en una forma inyectable apirógena, estéril, de dosificación unitaria (disolución, suspensión o emulsión, que puede haber sido reconstituida antes del uso), que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de estas formas inyectables estériles son suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica utilizando vehículos, agentes dispersantes o humectantes, agentes complejantes, polímeros, adyuvantes de la solubilidad y agentes suspensorios adecuados. Las formas inyectables estériles también puede ser disoluciones o suspensiones inyectables estériles en diluyentes o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicas, por ejemplo, como disoluciones en 1,3-butandiol. Entre los vehículos y disolventes farmacéuticamente aceptables que pueden emplearse están el agua, etanol, glicerol, disolución salina, dimetilsulfóxido, N-metilpirrolidona, dimetilacetamida, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de cloruro de sodio isotónica, y disolución de Hanks. Además, de modo convencional se emplean aceites no volátiles y estériles como disolventes o medios suspensorios. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, que incluye mono- o diglicéridos sintéticos, aceite de maíz, semilla de algodón, cacahuete y sésamo. Los ácidos grasos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, y ácido oleico y sus derivados de glicéridos, que incluyen aceite de oliva y aceite de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas, son útiles para la preparación de inyectables. Estas disoluciones o suspensiones oleosas también pueden contener diluyentes o dispersantes de alcoholes de cadena larga.

El vehículo también puede contener aditivos, tales como sustancias para potenciar la solubilidad, la isotonicidad, y la estabilidad química, por ejemplo, antioxidantes, tampones y conservantes.

30 Además, la composición que contiene la saponina esteroidea puede estar en una forma para ser reconstituida antes de la administración. Los ejemplos incluyen liofilización, secado por pulverización y similares, para producir una forma sólida adecuada para la reconstitución con un disolvente farmacéuticamente aceptable antes de la administración.

35 Las composiciones pueden incluir uno o más tampones, agentes de relleno, agentes isotónicos y crioprotectores y lioprotectores. Los ejemplos de excipientes incluyen sales fosfato, ácido cítrico, azúcares no reductores, tales como sacarosa o trehalosa, alcoholes polihidroxílicos, aminoácidos, metilaminas y sales liotrópicas, que se prefieren frente a los azúcares reductores, tales como maltosa o lactosa.

40 Cuando se administra por vía oral, la saponina esteroidea generalmente se formula en formas de dosificación unitaria, tales como comprimidos, comprimidos oblongos, obleas, polvos, gránulos, esferas, pastillas masticables, cápsulas, líquidos, suspensiones o disoluciones acuosas, o formas de dosificación similares, utilizando equipos y técnicas convencionales conocidos en la técnica. Estas formulaciones generalmente incluyen un vehículo sólido, semisólido o líquido. Los ejemplos de vehículos incluyen excipientes, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, aceite mineral, mantequilla de cacao, aceite de teobroma, alginatos, tragacanto, gelatina, jarabe, éteres de celulosa sustituida, polioxietileno-monolaurato de sorbitano, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y similares.

45 Puede prepararse un comprimido prensando o moldeando la saponina esteroidea opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Pueden prepararse comprimidos prensados mediante prensado, en una máquina adecuada, del ingrediente activo en una forma fluida, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un ligante, un lubricante, un diluyente inerte, un tensioactivo o un agente dispersante. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante el moldeado, en una máquina adecuada, de una mezcla del ingrediente activo en polvo y un vehículo adecuado humedecido con un diluyente líquido inerte.

La administración del agente de saponina esteroidea también puede emplear la tecnología de la liberación controlada.

55 Para la administración tópica, la composición de la presente invención puede estar en forma de una disolución, pulverización, loción, crema (por ejemplo, una crema no iónica), gel, pasta o ungüento. Como alternativa, la composición puede administrarse a través de liposomas, nanosomas, ribosomas o un vehículo nutridifusor. Puede utilizarse la administración tópica para el tratamiento de cánceres, tales como melanomas.

Se apreciará que, en el caso de que la composición farmacéutica también incluya un agente anticáncer, se aplicarán consideraciones similares a las descritas anteriormente para la formulación de la composición.

La presente invención también puede utilizarse para reducir la cantidad de un agente o un tratamiento anticáncer proporcionado a un sujeto para prevenir y/o tratar un cáncer.

5 A este respecto, la capacidad de una saponina esteroidea para aumentar el nivel de actividad de la terapia anticáncer puede utilizarse para reducir la dosis de la terapia anticáncer expuesta a un sujeto para lograr un nivel deseado de tratamiento.

10 La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para reducir la cantidad de una terapia anticáncer proporcionada a un sujeto para prevenir y/o tratar un cáncer, según la reivindicación 1.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea para la preparación de un medicamento para reducir la cantidad de una terapia anticáncer proporcionada a un sujeto para prevenir y/o tratar un cáncer, según la reivindicación 1.

15 La presente invención también puede utilizarse para estimular la apoptosis de una célula cancerosa debida a la exposición de la célula a un agente anticáncer. Por ejemplo, la saponina esteroidea puede utilizarse para estimular la apoptosis de una célula expuesta a un agente quimioterapéutico.

La presente invención también proporciona el uso de una saponina esteroidea según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para estimular la apoptosis de una célula cancerosa debida a la exposición de la célula cancerosa a una terapia anticáncer, según la reivindicación 1 o 2.

20 Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para estimular la apoptosis de una célula cancerosa debida a la exposición de la célula cancerosa a una terapia anticáncer, según la reivindicación 1 o 2.

La presente invención también puede utilizarse para reducir el nivel de resistencia de una célula cancerosa a un agente anticáncer.

25 Por ejemplo, la exposición de células cancerosas a un agente anticáncer, tal como un fármaco quimioterapéutico, conduce a un mayor nivel de resistencia de la célula al fármaco quimioterapéutico. En último término, esto puede conducir a que el cáncer desarrolle resistencia a múltiples fármacos.

30 La presente invención también proporciona el uso de la saponina esteroidea según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para reducir el desarrollo de resistencia en una célula cancerosa frente a una terapia anticáncer, según la reivindicación 1 o 2.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para reducir el desarrollo de resistencia en una célula cancerosa frente a una terapia anticáncer, según la reivindicación 1 o 2.

35 La presente invención también proporciona el uso de la saponina esteroidea y del agente anticáncer según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para reducir el nivel de resistencia de una célula cancerosa frente a un agente apoptótico.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona el uso de una saponina esteroidea según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para reducir el nivel de resistencia de una célula cancerosa frente a un agente anticáncer, según la reivindicación 1 o 2.

40 Los métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas son conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.; U.S. Pharmacopeia: National Formulary, 1984, Mack Publishing Company, Easton, Pa.; u M.E. Aulton, Pharmaceuticals, The Science of Dosage Form Design, 2ª ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002.

45 El transporte terapéutico de biomoléculas se realiza, en general, como se describe en Bladon, C. (2002), "Pharmaceutical Chemistry: Therapeutic Aspects of Biomolecules", John Wiley & Sons Ltd.

Descripción de realizaciones específicas

A continuación se hace referencia a experimentos que plasman los anteriores principios generales de la presente invención.

Ejemplo 1

50 *Métodos y reactivos generales*

(i) Saponinas esteroideas y agentes anticáncer

La diosgenina, dioscina: diosgenina Rha2, [Rha4], Glc, y la deltonina: diosgenina Rha2, [Glc4], Glc, se obtuvieron en el mercado en Ningbo Hanpharm Biotech Co Ltd, y la gracilina en ChromaDex, y la trilina en Aktin Chemicals.

5 La prosapogenina A: diosgenina Rha2, Glc, se sintetizó según el método descrito en Li et al., Carbohydr. Res., (2001) 331, 1-7. La dioscina y la prosapogenina A también se aislaron a partir de *Paris polyphylla*.

Las saponinas esteroideas se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para producir disoluciones madre 10 mM o 1 mM, a partir de las cuales se prepararon posteriores diluciones según fuera necesario para los experimentos individuales.

10 El cisplatino, docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, vincristina e imitanib se obtuvieron de fuentes comerciales y se conservaron a 4 °C o -20 °C, según fuera necesario. Estos son: paclitaxel (inyección de anzatax (Faulding)); sulfato de vincristina (Sigma); doxorubicina HCl (Sigma); docetaxel (Sigma); cisplatino (Sigma) y mesilato de imatinib (Novartis Glivec).

15 Los agentes quimioterapéuticos se prepararon como concentraciones madre según fuera necesario (se determina para cada ensayo) en el diluyente apropiado: DMSO, agua estéril o disolución salina. La disolución de DMSO solo se empleó como control negativo.

(ii) Células

Los tipos de células de cáncer humano fueron: A549 (pulmón); C180-13S (ovario); HT29 (colon); MCF7 (mama); PC3 (próstata); DU145 (próstata, independiente de hormonas); LNCap (dependiente de hormonas); K562 (leucemia). El tipo de célula de cáncer de ratón fue: B16 (melanoma).

20 Las células de cáncer se sembraron el día antes de la aplicación del fármaco por triplicado o por cuadruplicado en placas de 96 pocillos, se dejaron crecer en presencia del fármaco durante 6 días antes de determinar el crecimiento celular con relación a los pocillos control sin tratar con un ensayo de tinte.

(iii) Cultivo celular

25 Las células se sembraron por triplicado o por cuadruplicado a 3-4.000 por pocillo de microtitulación en 90 µl de medio de cultivo RPMI/suero de ternero fetal al 10%/mezcla de penicilina y estreptomina, se trataron con 10 µl de fármaco (preparado en una placa de dilución a 10x la concentración requerida), y se dejaron crecer hasta que los controles fueron casi confluentes (6 días).

30 SRB: Las placas se lavaron con PBS, se fijaron con alcoholes metilados, se lavaron con agua del grifo y se tiñeron con 50 µl/pocillo de disolución de SRB (sulforrodamina al 0,4% en ácido acético al 1%), seguido de un lavado con agua del grifo y ácido acético al 1%, una solubilización en Tris y la lectura de la absorbancia a 564 nm en un lector de ELISA.

35 MTS: Se añadieron 10 µl de la disolución de MTS/pocillo de células, las placas se dejaron en incubación durante 1-4 horas a 37 °C hasta que se desarrolló un color marrón oscuro, Después se añadieron 10 µl de SDS al 10%/pocillo para dispersar las células. Las placas de ensayo después se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA.

Los datos se recogieron utilizando el programa informático del lector de placas de ELISA, SOFTmax PRO 3.1.2, y después se importaron a EXCEL. Se calcula la media y DE de los duplicados como un porcentaje del control, después de restar el valor de blanco (pocillos sin células). Se trazó una gráfica de porcentaje del control frente a la dosis de agente, y se determinaron los valores de CI_{50} (concentración inhibidora semimáxima).

40 Como alternativa, las células se sembraron en pocillos de 2 ml y, después de 24 horas de crecimiento, se trataron con la saponina esteroidea a 0,1, 0,5 y 1,0 µM. Las células se recolectaron después de 24, 48 y 72 horas de incubación con el fármaco. En cada momento del tiempo, las células se contaron, se sedimentaron mediante centrifugación (5 minutos, 1500 rpm, TA), se resuspendieron en 1 ml de PBS, y se agitaron en vórtice suavemente. Se añadieron 2 ml de metal enfriado en hielo y las células se agitaron en vórtice. Cuando se hubieron recolectado las células de todos los momentos del tiempo, cada muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 4-5 minutos, se resuspendió en 400 µl de PBS y se añadieron 100 µl de 5x tinte de yoduro de propidio (PI) (véase a continuación). Las muestras se agitaron en vórtice y se filtraron a través de un filtro de nailon antes de un análisis de citometría de flujo a 488 nm. El contenido relativo en ADN de las subpoblaciones celulares se representa como histogramas, analizándose generalmente 20.000 células para cada muestra.

50 **Ejemplo 2**

Determinación de los valores de CI_{50} para las saponinas esteroideas y los agentes anticáncer

Se emplearon las siguientes líneas celulares de cáncer:

A549 - pulmón; HT29 - colon; MCF7 - mama; PC3 - próstata (independiente de hormonas); DU 145 - próstata (independiente de hormonas); LNCap - próstata (dependiente de hormonas); K562 - eritroleucemia humana.

5 Se ensayaron las siguientes saponinas esteroideas para la inhibición de líneas de células cancerosas cuando se emplean como agentes individuales:

Dioscina: diosgenina Rha2, [Rha4], Glc

Deltonina: diosgenina Rha2, [Glc4], Glc

Prosapogenina A: diosgenina Rha2, Glc

10 Se ensayaron los siguientes fármacos quimioterapéuticos y agentes de transporte molecular para la inhibición de células cancerosas cuando se emplean como agentes individuales:

Agentes quimioterapéuticos:

Cisplatino

Docetaxel

Paclitaxel

15 Doxorubicina

Vincristina

Agente de transporte molecular:

Imatinib

20 Las saponinas esteroideas y los agentes anticáncer listados anteriormente se disolvieron en DMSO y se diluyeron con medio de cultivo en las disoluciones requeridas para cada aplicación. La disolución de DMSO solo se empleó como control negativo.

25 Las células tumorales se sembraron por duplicado en placas de 96 pocillos a 2-5.000 por pocillo de microtitulación que contiene medio de cultivo RPMI/suero de ternero fetal al 10%. Se dejó que las células crecieran hasta que los controles fueron casi confluentes después de 5-6 días. Después las placas se lavaron con PBS, se fijaron en etanol y se tñeron con 50 µl/pocillo de disolución de SRB (sulforrodamina al 0,4% en ácido acético al 1%), seguido de un lavado con ácido acético al 1%, y una solubilización en Tris. La absorbancia se leyó a 564 nm utilizando un lector de ELISA.

30 La CI_{50} o concentración requerida para inhibir el crecimiento celular en 50% se determinó a partir de los datos de porcentaje de inhibición frente a la concentración utilizando los métodos de cálculo probit de Finney (Finney D.J. (1971), Probit Analysis, 3ª edición, Cambridge University Press).

Las siguientes concentraciones, descritas en la tabla 4, se utilizaron para las 8 células de las placas de ELISA 12 x 8.

Tabla 4

Concentración de células (µM)								
Célula de ELISA	1	2	3	4	5	6	7	8
Cisplatino	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0
Docetaxel	0,006	0,003	0,0015	0,00075	0,000375	0,000188	0,000094	0
Paclitaxel	0,0033	0,00167	0,00083	0,00042	0,00021	0,000104	0,000052	0
Doxorubicina	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,0031	0

Vincristina	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,00031	0
Imatinib	0,72	0,36	0,18	0,09	0,045	0,0225	0,0112	0

Se calcularon los siguientes valores de CI_{50} de la tabla 5 a partir de los datos de inhibición.

Tabla 5

	CI_{50} (μM)						
	DU145	LNCap	MCF7	HT29	PC3	A549	K562
Cisplatino	0,54	0,70	0,65	0,93	1,4	1,2	0,82
Docetaxel	0,00015	0,000026	0,000039	0,00051	0,00009	0,00027	0,00042
Paclitaxel	0,0027	0,0012	0,0011	>0,0033	0,0021	0,0032	>0,0033
Doxorrubicina	0,011	0,0039	0,014	0,028	0,022	0,016	0,0085
Vincristina	0,0029	0,00049	0,00049	0,0024	0,0011	0,0060	0,00021
Imatinib	>0,7	>0,7	>0,7	>0,7	>0,7	>0,7	0,085

5 Ejemplo 3

Determinaciones de los valores de CI_{50} y de la reducción en la dosificación del agente quimioterapéutico en mezclas de saponinas esteroideas con cisplatino, docetaxel, doxorrubicina y vincristina

10 Se empleó la metodología del sembrado de las células y de placas de ELISA del ejemplo 1 para determinar la inhibición de dos líneas de células cancerosas. Los valores de CI_{50} se determinaron para las saponinas esteroideas dioscina, deltonina y prosapogenina A, y sus mezclas con cisplatino, docetaxel, doxorrubicina y vincristina, utilizando las líneas celulares LNCap y MCF7.

Las mezclas de dos componentes se prepararon mezclando 50% de los valores de CI_{50} para cada componente, en las que los valores de CI_{50} de las saponinas esteroideas y los agentes quimioterapéuticos se indican en la tabla 6.

Tabla 6 - Valores de CI_{50} utilizados en el ensayo (μM)

	LNCap	MCF7
Dioscina	1	1
Deltonina	1	1
Prosapogenina A	2	2
Cisplatino	0,8	0,8
Cocetaxel	0,00003	0,00003
Doxorrubicina	0,004	0,015
Vincristina	0,0005	0,0005

15

Las mezclas se prepararon según se ilustra en la tabla 7.

Tabla 7

Concentraciones utilizadas para la dioscina y el cisplatino en una mezcla CI_{50} de dioscina:cisplatino 50:50 frente a la línea celular LNCap								
Célula de ELISA	1	2	3	4	5	6	7	8

Factor de multiplicación	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0
Dioscina (µM)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0
Cisplatino (µM)	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0

Así, en la célula de ELISA n.º 4 (factor de multiplicación = 1), la concentración es 50% de cada uno de los valores de CI₅₀ individuales: 50% de 1 µM para dioscina y 50% de 0,8 µM para cisplatino.

- 5 La tabla 8 proporciona otra ilustración del establecimiento de las concentraciones de células de ELISA, en la que, en la célula de ELISA n.º 4 (factor de multiplicación = 1), la concentración es 50% de cada uno de los valores de CI₅₀ individuales: 50% de 2 µM para prosapogenina A y 50% de 0,015 µM para doxorubicina frente a MCF7.

Tabla 8

Concentraciones utilizadas para la dioscina y el cisplatino en una mezcla CI ₅₀ de prosapogenina A:doxorubicina 50:50 frente a la línea celular MCF7								
Célula de ELISA	1	2	3	4	5	6	7	8
Factor de multiplicación	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0
Prosapogenina A (µM)	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0
Doxorubicina (µM)	0,06	0,03	0,015	0,0075	0,00375	0,00188	0,00094	0

- 10 Los datos inhibitorios para cada mezcla se utilizaron para determinar una CI₅₀ del valor CI₅₀, siendo las concentraciones utilizadas los valores del factor de multiplicación. Para determinar la contribución de CI₅₀ real de cada componente en la mezcla de dos componentes, la CI₅₀ del valor CI₅₀ se multiplicó por la CI₅₀ del componente individual. Esto entonces puede utilizarse para determinar la reducción en la contribución de CI₅₀ (es decir, la reducción en la dosis) del agente quimioterapéutico debida a la presencia de la saponina esteroidea en la mezcla. Un manera más sencilla para determinar la reducción en la dosis es utilizar la siguiente fórmula sencilla:

- 15 Reducción en la dosis (%) = $\frac{(CI_{50} \text{ del agente quimioterapéutico} - 0,5 \times (CI_{50} \text{ del } CI_{50})) \times 100}{CI_{50} \text{ del agente quimioterapéutico}}$

Las siguientes CI₅₀ de los valores CI₅₀ en la tabla 9 se determinaron para las saponinas esteroideas de este ejemplo.

Tabla 9

	LNCap CI ₅₀ del CI ₅₀	MCF7 CI ₅₀ del CI ₅₀
Dioscina	0,56	1,1
Deltonina	0,42	0,67
Prosapogenina A	0,89	1,1

- 20 Las CI₅₀ de los valores CI₅₀ para los agentes quimioterapéuticos y para sus mezclas con las saponinas esteroideas, más la reducción en la dosis de cada agente quimioterapéutico determinada cuando se mezcla con las saponinas esteroideas, se indican en la tabla 10.

Tabla 10 - Ejemplo de referencia: Mezclas de cisplatino

	LNCap CI ₅₀ del CI ₅₀	Cisplatino Reducción de la dosis	MCF7 CI ₅₀ del CI ₅₀	Cisplatino Reducción de la dosis
Cisplatino	0,37		0,82	
Cisplatino + dioscina	0,54	27%	1,5	9%

	LNCap CI ₅₀ del CI ₅₀	Cisplatino Reducción de la dosis	MCF7 CI ₅₀ del CI ₅₀	Cisplatino Reducción de la dosis
Cisplatino + deltonina	0,91	-23%	1,5	9%
Cisplatino + prosapogenina A	1,8	-143%	2,2	-34%

No se observa una reducción en la dosis eficaz o coherente en la dosificación de cisplatino en las mezclas de las saponinas esteroideas con cisplatino.

Mezclas de docetaxel

	LNCap CI ₅₀ del CI ₅₀	Docetaxel Reducción de la dosis	MCF7 CI ₅₀ del CI ₅₀	Docetaxel Reducción de la dosis
Docetaxel	3,7		8	
Docetaxel + dioscina	1,3	82%	3,2	80%
Docetaxel + deltonina	0,97	87%	1,7	89%
Docetaxel + prosapogenina A	2,0	73%	2,0	88%

5

Se observa una reducción coherente en la dosificación de docetaxel en las mezclas de las saponinas esteroideas con cisplatino.

Mezclas de doxorrubicina

	LNCap CI ₅₀ del CI ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis	MCF7 CI ₅₀ del CI ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis
Doxorrubicina	1,4		1,6	
Doxorrubicina + dioscina	0,89	68%	1,3	59%
Doxorrubicina + deltonina	1,1	61%	2,0	38%
Doxorrubicina + prosapogenina A	1,7	39%	2,5	22%

10 Se produce una reducción en la dosificación de doxorrubicina observada en las mezclas de las saponinas esteroideas con doxorrubicina, proporcionando la dioscina y la deltonina una mayor reducción que la prosapogenina A.

Ejemplo de referencia: Mezclas de vincristina

	LNCap CI ₅₀ del CI ₅₀	Vincristina Reducción de la dosis	MCF7 CI ₅₀ del CI ₅₀	Vincristina Reducción de la dosis
Vincristina	0,77		1,3	
Vincristina + dioscina	0,68	56%	1,8	31%
Vincristina + deltonina	1,1	29%	1,5	42%
Vincristina + prosapogenina A	1,8	-17%	2,1	19%

15 Se produce una reducción coherente en la dosificación de doxorrubicina observada en las mezclas de dioscina y deltonina con vincristina, mostrando la prosapogenina A una reducción cero de modo eficaz en la dosificación de vincristina.

Ejemplo 4

Determinación de los valores de CI_{50} y de la reducción en la dosificación de paclitaxel en mezclas de saponinas esteroideas con paclitaxel

5 Se empleó la metodología del sembrado de células y el cultivo en placas de ELISA del ejemplo 1 para determinar la inhibición de dos líneas de células cancerosas. Se determinaron los valores de CI_{50} para las saponinas esteroideas dioscina, deltonina y prosapogenina A, y sus mezclas con paclitaxel utilizando las líneas celulares A549 y MCF7.

Se prepararon mezclas de dos componentes de la misma manera que en el ejemplo 2, mezclando 50% de los valores de CI_{50} para cada componente, indicándose los valores de CI_{50} de las saponinas esteroideas y el paclitaxel en la tabla 11.

Tabla 11 - Valores de CI_{50} utilizados en el ensayo (μM)

	A549	MCF7
Dioscina	1	1
Deltonina	1	1
Prosapogenina A	2	2
Paclitaxel	0,003	0,001

10 Utilizando la metodología de cálculo descrita en el ejemplo 2, se determinaron las siguientes CI_{50} de los valores CI_{50} de la tabla 12 para las saponinas esteroideas de este ejemplo.

Tabla 12

	A549 CI_{50} del CI_{50}	MCF7 CI_{50} del CI_{50}
Dioscina	1,9	1,9
Deltonina	0,70	1,2
Prosapogenina A	0,99	1,0

15 Las CI_{50} de los valores CI_{50} para el paclitaxel y para sus mezclas con las saponinas esteroideas, más la reducción en la dosis de paclitaxel determinada cuando se mezcla con las saponinas esteroideas, se indican en la tabla 13.

Tabla 13 - Mezclas de paclitaxel

	LNCap CI_{50} del CI_{50}	Paclitaxel Reducción de la dosis	MCF7 CI_{50} del CI_{50}	Paclitaxel Reducción de la dosis
Paclitaxel	1,7		1,5	
Paclitaxel + dioscina	2,2	35%	1,9	37%
Paclitaxel + deltonina	1,0	71%	1,5	50%
Paclitaxel + prosapogenina A	2,3	32%	2,3	23%

20 Se produce una reducción en la dosificación del paclitaxel observada en mezclas de las saponinas esteroideas con doxorubicina, proporcionando la deltonina una mayor reducción que la dioscina y la prosapogenina A.

Ejemplo 5

Determinación de los valores de CI_{50} y de la reducción en la dosificación de un agente quimioterapéutico en mezclas de saponinas esteroideas con cisplatino, docetaxel, doxorubicina y vincristina

25 Se empleó la metodología del sembrado de las células y de placas de ELISA del ejemplo 1 para determinar la inhibición de cuatro líneas de células cancerosas. Los valores de CI_{50} se determinaron para las saponinas esteroideas dioscina, deltonina y prosapogenina A, y sus mezclas con cisplatino, docetaxel, doxorubicina y

vincristina, utilizando las líneas celulares PC3, DU145, A549 y HT29.

Las mezclas de dos componentes se prepararon de la misma manera que en el ejemplo 2, mezclando 50% de los valores de CI_{50} para cada componente, en las que los valores de CI_{50} de las saponinas esteroideas y los agentes quimioterapéuticos se indican en la tabla 14.

5

Tabla 14

Valores de CI_{50} utilizados en el ensayo (μM)	
Dioscina	1
Deltonina	1
Prosapogenina A	2
Cisplatino	0,8
Docetaxel	0,0002
Doxorrubicina	0,015
Vincristina	0,0025

Utilizando la metodología de cálculo descrita en el ejemplo 2, se determinaron las siguientes CI_{50} de los valores CI_{50} de la tabla 15 para las saponinas esteroideas de este ejemplo.

Tabla 15

	PC3 CI_{50} del CI_{50}	DU145 CI_{50} del CI_{50}	A549 CI_{50} del CI_{50}	HT29 CI_{50} del CI_{50}
Dioscina	2,9	1,9	2,3	2,8
Deltonina	1,2	0,9	0,9	0,9
Prosapogenina A	1,5	1,5	1,5	1,5

10

Las CI_{50} de los valores CI_{50} para los agentes quimioterapéuticos y para sus mezclas con las saponinas esteroideas, más la reducción en la dosis de cada agente quimioterapéutico determinada cuando se mezcla con las saponinas esteroideas, se indican en las tablas 16 a 19.

Tabla 16 - Ejemplo de referencia: Mezclas de cisplatino

	PC3 CI_{50} del CI_{50}	Cisplatino Reducción de la dosis	DU145 CI_{50} del CI_{50}	Cisplatino Reducción de la dosis
Cisplatino	2,7		1,6	
Cisplatino + dioscina	3,5	35%	2,9	9%
Cisplatino + deltonina	1,7	69%	1,9	41%
Cisplatino + prosapogenina A	2,0	63%	2,1	34%

15

Mezclas de cisplatino

	A549 CI_{50} del CI_{50}	Cisplatino Reducción de la dosis	HT29 CI_{50} del CI_{50}	Cisplatino Reducción de la dosis
Cisplatino	1,7		1,5	
Cisplatino + dioscina	3,0	12%	3,0	0%

	A549 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Cisplatino Reducción de la dosis	HT29 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Cisplatino Reducción de la dosis
Cisplatino + deltonina	1,7	50%	1,8	40%
Cisplatino + prosapogenina A	2,4	29%	2,8	7%

Con el cisplatino se produce una reducción en la dosificación proporcionada en todos los casos, excepto para la reducción de mínima a cero para cisplatino + dioscina con DU145 y HT29, y una reducción mínima para cisplatino + prosapogenina A con HT29.

5

Tabla 17 - Mezclas de docetaxel

	PC3 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Docetaxel Reducción de la dosis	DU145 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Docetaxel Reducción de la dosis
Docetaxel	2,9		3,1	
Docetaxel + dioscina	3,9	33%	3,8	39%
Docetaxel + deltonina	2,2	62%	1,9	69%
Docetaxel + prosapogenina A	2,6	55%	2,4	61%

Mezclas de docetaxel

	A549 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Docetaxel Reducción de la dosis	HT29 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Docetaxel Reducción de la dosis
Docetaxel	3,9		3,3	
Docetaxel + dioscina	3,8	51%	3,6	45%
Docetaxel + deltonina	1,7	78%	1,9	71%
Docetaxel + prosapogenina A	3	62%	3	55%

10 Con el docetaxel se produce una reducción en la dosificación proporcionada por cada una de las mezclas de saponinas esteroideas con cada una de las cuatro líneas celulares, tal como se ilustra en la tabla 17.

Tabla 18 - Mezclas de doxorubicina

	PC3 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis	DU145 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis
Doxorrubicina	5,5		3,1	
Doxorrubicina + dioscina	5	55%	3,4	45%
Doxorrubicina + deltonina	2,2	80%	2,3	63%
Doxorrubicina + prosapogenina A	2,9	74%	2,3	63%

Mezclas de doxorubicina

	A549 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis	HT29 Cl ₅₀ del Cl ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis
Doxorrubicina	3,2		4,7	
Doxorrubicina + dioscina	2,3	64%	3,5	63%

	A549 CI ₅₀ del CI ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis	HT29 CI ₅₀ del CI ₅₀	Doxorrubicina Reducción de la dosis
Doxorrubicina + deltonina	1,8	72%	2,2	77%
Doxorrubicina + prosapogenina A	2,7	58%	3	68%

Con la doxorrubicina se produce una reducción en la dosificación proporcionada por cada una de las mezclas de saponinas esteroideas con cada una de las cuatro líneas celulares, tal como se muestra en la tabla 18.

Tabla 19 - Ejemplo de referencia: Mezclas de vincristina

	PC3 CI ₅₀ del CI ₅₀	Vincristina Reducción de la dosis	DU145 CI ₅₀ del CI ₅₀	Vincristina Reducción de la dosis
Vincristina	3,2		8	
Vincristina + dioscina	2,3	64%	3,5	79%
Vincristina + deltonina	1,3	80%	1,8	89%
Vincristina + prosapogenina A	2,7	58%	2,5	84%

5

Mezclas de vincristina

	A549 CI ₅₀ del CI ₅₀	Vincristina Reducción de la dosis	HT29 CI ₅₀ del CI ₅₀	Vincristina Reducción de la dosis
Vincristina	8		7,5	
Vincristina + dioscina	3,1	81%	4,1	73%
Vincristina + deltonina	1,7	89%	2,2	85%
Vincristina + prosapogenina A	3	81%	3	80%

Con la vincristina se produce una reducción en la dosificación proporcionada por cada una de las mezclas de saponinas esteroideas con cada una de las cuatro líneas celulares, tal como se muestra en la tabla 19.

10 **Ejemplo 6**

Determinación de los valores de CI₅₀ y de la reducción en la dosificación del imatinib en mezclas de saponinas esteroideas con imatinib

15 Se empleó la metodología del sembrado de las células y de placas de ELISA del ejemplo 1 para determinar la inhibición de la líneas celular K562. Los valores de CI₅₀ se determinaron para las saponinas esteroideas dioscina, deltonina y prosapogenina A, y sus mezclas con imatinib, utilizando la línea celular K562.

Las mezclas de dos componentes se prepararon de la misma manera que en el ejemplo 2, mezclando 50% de los valores de CI₅₀ para cada componente, en las que los valores de CI₅₀ de las saponinas esteroideas y el imatinib se indican en la tabla 20.

Tabla 20

Valores de CI ₅₀ utilizados en el ensayo (μM)	
Dioscina	1
Deltonina	1
Prosapogenina A	2
Imatinib	0,09

Utilizando la metodología de cálculo descrita en el ejemplo 2, se determinaron las siguientes CI_{50} de los valores CI_{50} para las saponinas esteroideas de este ejemplo y se muestran en la tabla 21.

Tabla 21

	K562 CI_{50} del CI_{50}
Dioscina	1,2
Deltonina	0,69
Prosapogenina A	1,2

5

Las CI_{50} de los valores CI_{50} para el imatinib y para sus mezclas con las saponinas esteroideas, más la reducción en la dosis del imatinib determinada cuando se mezcla con las saponinas esteroideas se indican en la tabla 22.

Tabla 22 - Mezclas de imatinib

	K562 CI_{50} del CI_{50}	Imatinib Reducción de la dosis
Imatinib	1,6	
Imatinib + dioscina	1,4	56%
Imatinib + deltonina	1,1	66%
Imatinib + prosapogenina A	2	38%

10 Con el imatinib se produce una reducción en la dosificación proporcionada por cada una de las mezclas de saponinas esteroideas con la línea celular K562.

Ejemplo 7

Determinación del grado de potenciación in vivo de la actividad anticáncer de un fármaco quimioterapéutico cuando se coadministra con una saponina esteroidea

15 El 5-fluorouracilo (5FU) es el principal fármaco quimioterapéutico utilizado para tratar el cáncer de colon; de modo más habitual, se coadministra con otros agentes quimioterapéuticos. Este estudio compara la coadministración de 5-fluorouracilo y deltonina, con la administración de una monoadministración de 5-fluorouracilo y de deltonina.

Se instaló un microchip en 72 ratones hembra nude Balb/c, se pesaron y se asignaron aleatoriamente, basándose en el peso corporal, a 8 grupos con 9 ratones por grupo.

20 Los tratamientos, que fueron todos formulados en NMP:PEG 300:agua (1:9:10, en v/v) y se administraron a diario mediante una inyección intravenosa para el 5-fluorouracilo y, para lo demás, mediante una inyección intraperitoneal, se indican en la siguiente tabla (NMP= N-metilpirrolidona).

Tabla 23

Tratamiento	Dosis	Administración
5-fluorouracilo	37,5 mg/kg	semanal i.p.
5-fluorouracilo + deltonina	37,5/1,65 mg/kg	semanal i.v./diario i.p.
5-fluorouracilo + deltonina	37,5/3,3 mg/kg	semanal i.v./diario i.p.
5-fluorouracilo + deltonina	37,5/6,6 mg/kg	semanal i.v./diario i.p.
Deltonina	1,65 mg/kg	diario i.p.

Tratamiento	Dosis	Administración
Deltonina	3,3 mg/kg	diario i.p.
Deltonina	6,6 mg/kg	diario i.p.

5 Se cultivaron células de carcinoma de próstata humanas HT29 en medio de cultivo celular RPMI 1640, que se suplementó con FBS al 10% y penicilina-estreptomicina (50 IU/ml de concentración final). Las células se recolectaron mediante tripsinización, se lavaron dos veces en HBSS y se contaron. Las células después se resuspendieron en HBSS y se ajustaron a un volumen final que contenía 2×10^7 células/ml. Para la inoculación, la aguja se introdujo a través de la piel hacia el espacio subcutáneo justo debajo del hombro derecho, en donde se descargaron 100 μ l de células (2×10^6).

10 Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron una media mayor que 200 mm³ se comenzó el tratamiento (día 0). Los volúmenes tumorales se midieron 3 veces semanales, y se determinaron según la fórmula:

$$V \text{ (mm}^3\text{)} = \text{longitud} \times \text{diámetro}^2 \times \pi/6$$

El tratamiento continuó durante 17 días. La media de los volúmenes tumorales para cada régimen de dosificación se indica en la tabla 24 y se presenta gráficamente en la figura 1.

Tabla 24

Tratamiento/Días	0	2	4	7	9	11	14	16	18
5-fluorouracilo (5FU) (37,5 mg/kg) (1 x semanal)	236	280	307	330	432	511	681	676	824
5FU/deltonina (37,5/1,65 mg/kg) (1 x semanal/diario)	216	207	249	294	255	339	386	441	523
5FU/deltonina (37,5/3,3 mg/kg) (1 x semanal/diario)	235	212	229	278	264	315	381	451	598
5FU/deltonina (37,5/6,6 mg/kg) (1 x semanal/diario)	236	206	244	281	292	339	440	532	543
Deltonina (1,65 mg/kg) (diario)	236	260	299	294	350	462	594	644	776
Deltonina (3,3 mg/kg) (diario)	236	242	271	331	413	489	558	742	842
Deltonina (6,6 mg/kg) (diario)	235	233	265	310	399	490	588	671	692

15 Los volúmenes tumorales con los tratamientos combinados de deltonina con 5-fluorouracilo son menores que los volúmenes tumorales de cualquiera de los monoterapias, es decir, el 5-fluorouracilo por sí solo, o cualquiera de los 3 tratamientos de deltonina por sí sola.

REIVINDICACIONES

1.- El uso de una saponina esteroidea y un agente anticáncer para la preparación de un medicamento para:

- (i) inhibir el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto;
- (ii) inhibir la formación y/o el crecimiento de un tumor en un sujeto; y/o
- (iii) prevenir y/o tratar un cáncer en un sujeto;

5

en el que la saponina esteroidea se selecciona del grupo que consiste en deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc), y prosapogenina A (diosgenina Rha2, Glc), y el agente anticáncer se selecciona de uno o más del grupo que consiste en taxol (paclitaxel), docetaxel, doxorubicina, imatinib, y 5-fluorouracilo.

10

2.- Una composición anticáncer, incluyendo dicha composición un agente anticáncer y una saponina esteroidea, en la que la saponina esteroidea se selecciona del grupo que consiste en deltonina (diosgenina Rha2, [Glc4], Glc), dioscina (diosgenina Rha2, [Rha4], Glc), y prosapogenina A (diosgenina Rha2, Glc), y el agente anticáncer se selecciona de uno o más del grupo que consiste en taxol (paclitaxel), docetaxel, doxorubicina, imatinib, y 5-fluorouracilo.

15

Fig. 1

