

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 150**

21 Número de solicitud: 201331376

51 Int. Cl.:

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

C07C 403/24 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

23.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.03.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (85.0%)
C/ Einstein, 3
28049 Madrid ES y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA (15.0%)**

72 Inventor/es:

**DOMÍNGUEZ MIÑOZ, Gemma;
SAN MILLÁN BLANCO, Coral;
SOLDEVILLA NAVARRO, Beatriz y
BONILLA VELASCO, Félix**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Compuestos para el tratamiento del cáncer**

57 Resumen:

Compuestos para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere a una composición que comprende β -criptoxantina y oxaliplatino y a un kit que comprende una composición que comprende β -criptoxantina y una composición que comprende oxaliplatino. La invención también se refiere a los usos de la composición y kit de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer y al uso de β -criptoxantina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino. La invención se refiere también a métodos *in vitro* para seleccionar una terapia para el tratamiento de cáncer y a métodos para seleccionar un sujeto que padece cáncer que comprenden determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra del sujeto y comparar el nivel de expresión obtenido con un valor de referencia.

ES 2 532 150 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento del cáncer

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5

La presente invención se encuadra, en general, dentro del campo de tratamiento de enfermedades, concretamente cáncer. En particular, la invención se relaciona con una composición que comprende oxaliplatino y β -criptoxantina, con kits que comprenden, por separado, una composición que comprende oxaliplatino y una composición que
10 comprende β -criptoxantina, y con sus aplicaciones, así como con el empleo de β -criptoxantina con fines terapéuticos, en concreto, en el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La incidencia global prevista de cáncer para la población española en el año 2.015 es de 222.069 personas (136.961 varones y 85.108 mujeres), siendo el tipo más frecuente el cáncer colorrectal, por delante, en términos globales, del cáncer de pulmón y del cáncer de mama.

20 El cáncer de colon o cáncer colorrectal (CCR) constituye un problema sanitario importante en España y en el resto de los países de la Unión Europea (UE), diagnosticándose cada semana más de 500 nuevos pacientes con esta enfermedad. Aunque el CCR puede presentarse a cualquier edad, más del 90% de los pacientes tienen más de 40 años; a partir de esa edad, el riesgo se duplica cada diez años.

25 Además de la edad, existen otros factores de alto riesgo, entre ellos, antecedentes familiares de CCR y pólipos, y antecedentes personales de colitis ulcerosa, pólipos en el colon o cáncer en otros órganos, especialmente cáncer de mama o de útero.

En la última década se ha asistido a una mejoría del pronóstico asociado al CCR
30 debido al avance en el conocimiento de los mecanismos que participan en el desarrollo y la progresión del CCR, a la identificación de muchos de los factores genéticos implicados en la caracterización de la historia natural de esta neoplasia, al establecimiento de diversas estrategias preventivas, y a la introducción de nuevas estrategias terapéuticas.

35

- El tratamiento curativo de estos pacientes implica cirugía y/o quimioterapia. Para pacientes con enfermedad avanzada, la quimioterapia paliativa se administra con frecuencia y puede mejorar significativamente la calidad de vida y la supervivencia total de los pacientes. Durante más de cuatro décadas el análogo de pirimidina 5-fluorouracilo (5-FU) ha sido el método de referencia para el tratamiento del CCR. Sin embargo, sólo alrededor del 20% de los pacientes que sufren CCR se benefician del tratamiento con 5-FU, bien como terapia adyuvante o bien como terapia para el tratamiento de la enfermedad avanzada (Moertel CG, et al., *Ann Intern Med* 1995; 122: 321-6; Petrelli N, et al., *J Clin Oncol* 1989; 7: 1419-26).
- Recientemente, se han aprobado agentes quimioterapéuticos adicionales para el tratamiento de estos pacientes y son ahora de uso común. Estos incluyen el inhibidor de la topoisomerasa I irinotecán, el compuesto de platino oxaliplatino y anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos nuevos agentes han aumentado el porcentaje de pacientes con enfermedad avanzada con una respuesta objetiva hasta aproximadamente el 50% y una mejora modesta pero significativa en su supervivencia total.
- El oxaliplatino (la tercera generación de drogas quimioterápicas basadas en el platino) es una droga de primera línea de elección en el tratamiento del CCR. Es un potente inhibidor de la síntesis de ADN que utiliza como ligando portador el 1,2-diaminociclohexano. El uso de este fármaco antitumoral tiene un impacto positivo en el pronóstico de estos pacientes, pero puede inducir diversos efectos secundarios. Uno de los efectos secundarios más limitantes en el uso del oxaliplatino es su acumulación en el sistema nervioso y la consecuente inducción de neurotoxicidad. Dichos efectos secundarios reducen la calidad de vida y hacen necesario reducir la dosis de oxaliplatino, reduciéndose por tanto la eficacia del tratamiento.
- Una estrategia para reducir la toxicidad consiste en el uso de infusiones de calcio y magnesio que reducen la neurotoxicidad del oxaliplatino. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que esta estrategia no presenta la efectividad deseada (Gamelin L. et al., *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 7, pp. 1188–1189, 2008).
- Distintos autores apoyan la necesidad de investigar estrategias alternativas que permitan reducir la dosis acumulada de oxaliplatino (Stein y col., *Expert Opin.*

Pharmacother. (2012) 13(1):125-137, 2012), por lo que sería conveniente identificar compuestos que actúen de manera sinérgica con oxaliplatino, y, por tanto, que permitieran reducir la dosis de oxaliplatino a administrar.

- 5 Aunque el oxaliplatino parece tener actividad aditiva o sinérgica en combinación con muchos agentes antitumorales en modelos preclínicos, algunas combinaciones no han mostrado efectos *in vivo* o están asociadas en ocasiones con un incremento de toxicidad.
- 10 Se han descrito diversos compuestos que actúan de manera sinérgica con oxaliplatino; sin embargo, algunos de esos compuestos no son útiles *in vivo*, como sucede con la curcumina (Li L. et al., Mol Cancer Ther April 2007 6; 127). En otros casos, tan sólo se ha demostrado un efecto sinérgico *in vitro*, como, por ejemplo, con los fármacos endostar (Jin F. et al., PLoS One. 2012;7(10):e47161), decitabina (Flis S. et al., Cancer
- 15 Cell International 2009, 9:10) o sulindaco (Flis S. et al., Anticancer Research January 2009 vol. 29 no. 1 435-441).

En otros casos, los ensayos realizados con compuestos que actúan de manera sinérgica con oxaliplatino parecen no ser reproducibles ya que no se observa el efecto

20 sinérgico en algunas de las líneas celulares analizadas; este es el caso de, por ejemplo, el dasatinib, un inhibidor de la familia Src, que actúa de manera sinérgica con el oxaliplatino solo en algunas de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon (Kopetz S. et al., Cancer Res May 1, 2009 69; 3842) y del cetuximab que, en combinación con oxaliplatino, tiene un efecto sinérgico en la línea celular de carcinoma

25 de colon HCT-8 pero que no es efectivo en otra línea celular de carcinoma de colon (HCT-116) (Balin-Gauthier D. et al., Proc Amer Assoc Cancer Res, Volume 47, 2006).

Por tanto, existe la necesidad de identificar nuevos compuestos capaces de potenciar el efecto antitumoral de oxaliplatino *in vivo*.

30

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende oxaliplatino y β -criptoxantina.

35

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende, por separado, una composición que comprende oxaliplatino y una composición que comprende β -criptoxantina. En una realización particular, dicho kit permite la administración conjunta o separada, simultánea o secuencial, de dichas composiciones.

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de β -criptoxantina, o de dicha composición, o de dicho kit, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

- 10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de β -criptoxantina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer en un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar una
15 terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto que comprende:

- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,
- 20 en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar una
25 terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto y que está siendo tratado con oxaliplatino que comprende:

- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
- ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor
30 de referencia,

en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina para su administración a dicho sujeto que padece un cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino.

35

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece cáncer para una terapia que comprende β -criptoxantina, comprendiendo dicho método:

- 5
- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

10 en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona dicho paciente para dicha terapia que comprende β -criptoxantina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para una terapia que comprende β -criptoxantina, comprendiendo dicho método:

- 15
- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

20 en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona dicho sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para dicha terapia que comprende β -criptoxantina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto en necesidad de tratamiento, que comprende la administración a

25 dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de β -criptoxantina, o de una composición que comprende oxaliplatino y β -criptoxantina, o de (i) una composición que comprende oxaliplatino y (ii) una composición que comprende β -criptoxantina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento del

30 cáncer en un sujeto sometido a tratamiento con oxaliplatino, en necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de β -criptoxantina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35

Figura 1. La β -criptoxantina regula la expresión de las isoformas TAp73 y Δ Np73 (DAp73 en la figuras) en líneas celulares de cáncer de colon. **A.** HCT-116; **B.** SW480-ADH; y **C.** SW1417. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

5 **Figura 2.** Aumento de la inducción de muerte celular por el tratamiento combinado de oxaliplatino más β -criptoxantina vs tratamiento con oxaliplatino de forma aislada. **A.** HCT-116; **B.** SW480-ADH; y **C.** SW1417.

Figura 3. Disminución de la viabilidad celular (medida mediante un ensayo de MTT)
10 por el tratamiento combinado de oxaliplatino más β -criptoxantina vs tratamiento con oxaliplatino de forma aislada. **A.** HCT-116; **B.** SW480-ADH; y **C.** SW1417.

Figura 4. Viabilidad celular tras tratamiento de las células HCT-116 con β -criptoxantina y oxaliplatino a la mitad de dosis (50 μ M). Comparación con el tratamiento combinado
15 usando oxaliplatino 100 μ M.

Figura 5. Efecto antiproliferativo de la β -criptoxantina a los días 8 y 10 de tratamiento en la línea celular HCT-116. * $p < 0,05$.

20 **Figura 6.** A. Ensayo de apoptosis (Anexina V-FITC/IP) en las células HCT-116 (**A1**) y SW480 (**A2**). Ensayo de viabilidad MTT en las células HCT-116 (**B1**) y SW480 (**B2**). * $p < 0,05$.

Figura 7. Ensayo en ratones inmunodeprimidos. Evaluación del crecimiento tumoral
25 en cuatro grupos de tratamiento: Grupo 1) vehículo; Grupo 2) β -criptoxantina 10 μ M; Grupo 3) vehículo junto con oxaliplatino 3 mg/kg; Grupo 4) β -criptoxantina 10 μ M junto con oxaliplatino 3 mg/kg. Vehículo y β -criptoxantina son administrados por vía oral. Oxaliplatino es administrado por vía intraperitoneal. Inicio 1, tamaño tumoral al inicio del primer tratamiento. Final 1, crecimiento tumoral tras el primer ciclo de tratamiento.
30 Inicio 2, crecimiento tumoral al finalizar el periodo de descanso. Final 2, crecimiento tumoral tras el segundo ciclo de tratamiento. * Reducción significativa ($p < 0,05$) del crecimiento tumoral del grupo tratado con β -criptoxantina suministrada de forma aislada respecto al grupo control (tratado con vehículo) a días 6 y 11. ** Reducción significativa ($p < 0,05$) del crecimiento tumoral del grupo tratado con la combinación de
35 oxaliplatino y β -criptoxantina respecto al grupo al que se le administra oxaliplatino o β -criptoxantina de manera aislada tanto al final del ciclo 1 como al final del ciclo 2.

Figura 8. Ensayo en ratones inmunodeprimidos. La β -criptoxantina (10 μ M concentración final en ratón) fue suministrada intraperitonealmente. Tratamiento con 2 ciclos de oxaliplatino 3 mg/kg (vehículo+oxal3) o tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino (β 10+oxal3). Entre los 2 ciclos hubo un periodo de 5 días de descanso en el que se continuó administrando β -criptoxantina pero no oxaliplatino. Inicio 1, tamaño tumoral al inicio del primer tratamiento. Final 1, crecimiento tumoral tras el primer ciclo de tratamiento. Inicio 2, crecimiento tumoral al finalizar el periodo de descanso. Final 2, crecimiento tumoral tras el segundo ciclo de tratamiento.

10

Figura 9. Ensayo en ratones inmunodeprimidos. La β -criptoxantina (10 μ M concentración final en ratón) es suministrada intraperitonealmente. En este experimento la dosis de oxaliplatino suministrada fue de 1,5 mg/kg. Tratamiento con 2 ciclos de oxaliplatino (vehículo+oxal1,5) o tratamiento combinado de β -criptoxantina y oxaliplatino (β 10+oxal1,5). Entre los 2 ciclos hubo un periodo de 5 días de descanso en el que se continuó administrando β -criptoxantina pero no oxaliplatino. Inicio 1, tamaño tumoral al inicio del primer tratamiento. Final 1, crecimiento tumoral tras el primer ciclo de tratamiento. Inicio 2, crecimiento tumoral al finalizar el periodo de descanso. Final 2, crecimiento tumoral tras el segundo ciclo de tratamiento. * $p < 0,05$.

20

Figura 10. Ensayo en ratones inmunodeprimidos. Comparación de la respuesta al tratamiento combinado de oxaliplatino (1,5 mg/kg) y β -criptoxantina intraperitoneal a una concentración final en ratón de 10 μ M (β 10+oxal1,5) frente a los tratamientos individuales de oxaliplatino 1,5 mg/kg (vehículo+oxal1,5) y oxaliplatino 3 mg/kg (vehículo+oxal3). ** $p < 0,001$.

25

Figura 11. Niveles del ARNm que codifica la isoforma Δ Np73 (ARNm de Δ Np73) en los tumores de los ratones después del tratamiento, observándose que la β -criptoxantina redujo significativamente los niveles de ARNm después del tratamiento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

30

Figura 12. A. Peso de los ratones antes y después de los diferentes tratamientos. No se observan diferencias significativas. **B.** Parámetros bioquímicos después de los diferentes tratamientos. No se observan diferencias significativas.

35

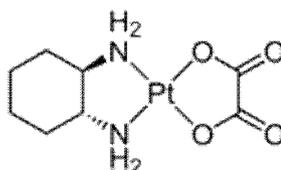
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado tanto en experimentos *in vitro* como en ensayos en animales, que el tratamiento combinado de oxaliplatino y β -criptoxantina induce un porcentaje significativamente mayor de muerte de células tumorales que el alcanzado mediante la exposición aislada a las mismas concentraciones de oxaliplatino, lo que indica que la β -criptoxantina potencia el efecto antitumoral mediado por el oxaliplatino. Además, la β -criptoxantina administrada de manera aislada presenta un efecto antiproliferativo similar al observado para el oxaliplatino en experimentos *in vivo* aunque menos efectivo que el del oxaliplatino *in vitro*. Adicionalmente, en experimentos *in vitro*, dosis bajas de oxaliplatino combinadas con β -criptoxantina producen el mismo porcentaje de muerte de células tumorales que dosis dobles de oxaliplatino administrado de manera aislada. Por tanto, en este caso, el tratamiento combinado de oxaliplatino y β -criptoxantina podría disminuir los efectos secundarios producidos por la administración individual de oxaliplatino debido a que se podrían utilizar dosis más bajas de oxaliplatino que las convencionalmente utilizadas para alcanzar la misma respuesta antitumoral. El mecanismo que subyace a este efecto de terapia combinada (oxaliplatino + β -criptoxantina) parece basarse en la regulación negativa de la isoforma Δ Np73 por la β -criptoxantina.

20 Composiciones de la invención

En un aspecto la invención se relaciona con una composición, en adelante "composición de la invención", que comprende oxaliplatino y β -criptoxantina.

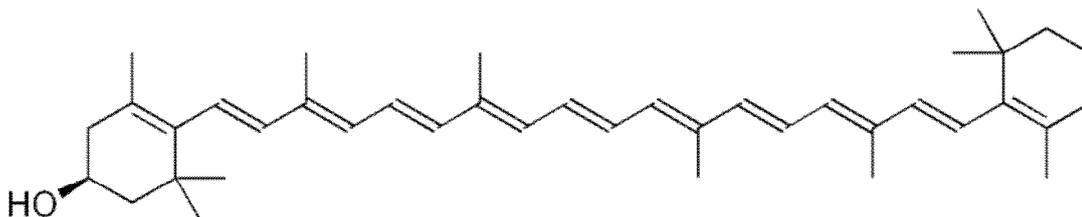
25 El término "oxaliplatino", tal como aquí se usa, se refiere a un fármaco quimioterapéutico basado en platino y corresponde al compuesto etanedioato;platinum(+4)cación; (2-azanidilciclohexil)azanida, con número CAS 63121-00-6, y fórmula química:



30

El oxaliplatino es el principio activo del medicamento Eloxatin® (Sanofi-Aventis, S.A.). Salvo que se indique lo contrario, el término “oxaliplatino” incluye sus prodrogas, sales, solvatos o clatratos útiles para su uso en Medicina.

- 5 El término “β-criptoxantina” o “beta-criptoxantina”, tal como aquí se usa, se refiere al compuesto (3R)-beta,beta-caroten-3-ol, con número CAS 472-70-8, y fórmula química:



- 10 Salvo que se indique lo contrario, el término “β-criptoxantina” incluye sus prodrogas, sales, solvatos o clatratos útiles para su uso en Medicina.

La cantidad de oxaliplatino presente en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, el porcentaje en peso de oxaliplatino con respecto al total de la composición de la invención es de,
 15 al menos, un 0,10% 0,50%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o, al menos un 95%.

La cantidad de β-criptoxantina presente en la composición de la invención puede
 20 variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, el porcentaje en peso de β-criptoxantina con respecto al total de la composición de la invención es de, al menos, un 0,10% 0,50%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o, al menos un 95%.

25 La relación ponderal entre oxaliplatino y β-criptoxantina presente en la composición de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en general, dicha relación se elegirá teniendo en cuenta factores tales como la enfermedad a tratar, la edad, el sexo, el peso, etc. del sujeto a recibir la composición de la invención. Preferiblemente, dicha relación ponderal entre oxaliplatino y β-criptoxantina es aquella
 30 que resulta en un efecto ventajoso, en concreto, en un aumento del efecto terapéutico de la composición de la invención en relación con cada uno de sus componentes de forma que sea posible llegar al mismo resultado con dosis menores de cada uno de los

componentes, reduciendo así los efectos secundarios sobre el sujeto que recibe la composición de la invención.

5 La composición de la invención puede contener, además, un vehículo para su administración a un sujeto.

10 En una realización particular, la composición de la invención se administrará a un sujeto en una forma farmacéutica de administración adecuada; para ello, la composición de la invención incluirá, al menos, vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Por tanto, en una realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica, en adelante "composición farmacéutica de la invención", que comprende, además de oxaliplatino y β -criptoxantina como ingredientes activos, al menos un vehículo, preferentemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 El término "vehículo", en el sentido utilizado en esta descripción, incluye, en general, cualquier diluyente o excipiente con el que se administra un ingrediente activo. Preferentemente, dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable para su administración a un sujeto, es decir, es un vehículo (e.g., un excipiente) aprobado por una agencia reguladora, por ejemplo, la Agencia Europea del Medicamento (EMA), la "Food & Drug Administration" (FDA) norteamericana, etc., o están incluidos en una farmacopea (e.g., la Farmacopea europea, estadounidense, etc.) reconocida en general para su uso en animales, y, más particularmente, en seres humanos.

25 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se prepara en una forma farmacéutica de administración por vía oral; dicha forma farmacéutica de administración por vía oral puede ser sólida (e.g., cápsula, comprimido, gragea, polvo, etc.), líquida, etc.

30 En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención se prepara en una forma farmacéutica de administración por una vía diferente a la vía oral, por ejemplo, por vía parenteral (e.g., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.), o mediante absorción a través de la mucosa o epitelio, etc.

35

- En general, se elegirán los vehículos farmacéuticamente aceptables en función de la forma farmacéutica de administración elegida para la composición farmacéutica de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, para la administración oral de la composición farmacéutica de la invención en forma de comprimidos o cápsulas, los
- 5 ingredientes activos (oxaliplatino y β -criptoxantina) se pueden combinar con cualquier vehículo inerte oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, talco, manitol, etc. Además, si se desea, o si se necesita, también se pueden incorporar
- 10 aglutinantes (e.g., almidón, gelatina, azúcares naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, alginato, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, etc.), lubricantes (e.g., ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, etc.), disgregantes (e.g., almidón, metilcelulosa, goma guar, etc.), así como edulcorantes, saborizantes y/o conservantes cuando sea apropiado. Las formas farmacéuticas sólidas para administración por vía oral pueden comprender entre
- 15 aproximadamente el 5% y aproximadamente el 95% en peso de los ingredientes activos, intervalo que incluye todos los valores y sub-intervalos comprendidos entre los mismos, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 86 y 90 % en peso.
- 20 Asimismo, si se desea, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en una forma farmacéutica de liberación sostenida para proporcionar la liberación a velocidad controlada de uno cualquiera, o de ambos, ingredientes activos para optimizar sus efectos terapéuticos. Las formas farmacéuticas adecuadas para liberación sostenida incluyen comprimidos estratificados que contienen capas de
- 25 diversas velocidades de disgregación o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con los ingredientes activos y que se configuran en forma de comprimido o cápsulas que contienen dichas matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.
- 30 Las preparaciones de la composición farmacéutica de la invención en forma líquida incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Ejemplos ilustrativos, no limitativos ejemplos no limitativos de medios en los que los ingredientes activos se pueden disolver, suspender o con los que se pueden formar emulsiones, incluyen incluyen agua, etanol, mezclas agua-etanol o agua-propilenglicol, etc., aceites, incluyendo
- 35 aceites derivados del petróleo, aceites de animales, aceites vegetales o aceites sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de

sésamo, etc. En una realización particular, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, preferiblemente, agua, disoluciones acuosas de solución salina, o disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol para las disoluciones inyectables.

- 5 Asimismo, se incluyen preparaciones en forma sólida de la composición farmacéutica de la invención destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración por vía oral o parenteral. Las formas líquidas de este tipo incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones.
- 10 Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de ingredientes activos, de los vehículos a utilizar, y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

15

- La composición de la invención, así como la composición farmacéutica de la invención, también puede contener, si se desea, un ingrediente activo adicional, diferente al oxaliplatino y a la β -criptoxantina, tal como, un agente antitumoral, por ejemplo, un agente antitumoral empleado en quimioterapia o inmunoterapia para el tratamiento del
- 20 cáncer, más concretamente, en el tratamiento de un tipo de cáncer cuyas células expresan un nivel de $\Delta Np73$ superior (incrementado) al de un valor de referencia, tal como, por ejemplo, cáncer colorectal (CCR), cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de médula ósea, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroide, leucemia, o neuroblastoma. Por
- 25 tanto, en una realización particular, la composición de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, comprende, además de oxaliplatino y β -criptoxantina, otro agente antitumoral, tal como, por ejemplo, un agente antitumoral empleado en quimioterapia o inmunoterapia para el tratamiento del cáncer, en particular, para el tratamiento de un tipo de cáncer cuyas células expresan un nivel de $\Delta Np73$ superior
- 30 (incrementado) al de un valor de referencia, y, opcionalmente, un vehículo, preferentemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además de oxaliplatino y β -criptoxantina, un agente antitumoral útil para el tratamiento del CCR diferente al oxaliplatino y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

En el sentido utilizado en esta descripción, un “agente antitumoral” es un compuesto o agente químico, físico o biológico con propiedades antiproliferativas, antioncogénicas y/o carcinostáticas que puede emplearse para inhibir el crecimiento, la proliferación, el desarrollo y/o la metástasis de un tumor. A modo ilustrativo, los agentes antitumorales
 5 pueden ser (i) antimetabolitos, tales como antifolatos y análogos de purina; (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos; (iii) hormonas y antagonistas de las mismas, tales como andrógenos y corticosteroides; y (iv) agentes biológicos, tales como vectores virales. A modo ilustrativo, no limitativo, la solicitud de patente WO2005/112973 incluye una relación de compuestos que pueden
 10 emplearse como agentes antitumorales para la puesta en práctica de la presente invención.

El término “inmunoterapia”, tal como aquí se usa, se refiere a una colección de estrategias de tratamiento basadas en el concepto de modular el sistema inmune para
 15 alcanzar un fin profiláctico y/o terapéutico. En una forma de realización particular, la inmunoterapia implica el uso de anticuerpos anti-VEGF y, más preferiblemente, bevacizumab o anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cetuximab.

20 El término “quimioterapia”, tal como aquí se usa, se refiere al tratamiento del cáncer usando agentes químicos específicos o fármacos que destruyen células y tejidos malignos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes quimioterapéuticos (o quimioterápicos) incluyen:

- 25 - agentes alquilantes, tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucilo, nimustina, melfalán y similares;
- antraciclinas, tales como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina y similares;
- 30 - compuestos de taxano, tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y similares;
- inhibidores de la topoisomerasa, tales como, por ejemplo, etopóxido,
 35 tenipóxido, irinotecán, tulipóxido y similares;

- análogos de nucleótidos, tales como, por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, ftorafur y similares;
- 5 - agentes a base de platino, tales como, por ejemplo, carboplatino, cisplatino y similares;
- agentes antineoplásicos, tales como, por ejemplo, vincristina, leucovorina, lomustina, procarbazona y similares;
- 10 - moduladores hormonales, tales como, por ejemplo, tamoxifeno, finasterida, inhibidores de la 5- α -reductasa y similares; y
- alcaloides de la vinca, tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y similares.
- 15

Una relación más amplia de agentes quimioterápicos susceptibles de ser utilizados en la presente invención se describe con más detalle en The Merck Index, 13ª Edición.

- 20 En el caso particular del CCR, los agentes antitumorales químicos que habitualmente se usan en el tratamiento de dicho CCR incluyen, sin limitación, agentes a base de platino, análogos de nucleótidos, tales como fármacos antimetabolitos de pirimidina, agentes antineoplásicos tales como leucovorina y combinaciones de los mismos.
- 25 Entre los “agentes a base de platino” adecuados para el tratamiento del CCR se encuentran cisplatino cDDP o cis-iaminodicloroplatino (II), carboplatino, y combinaciones de los mismos, además del mencionado oxaliplatino. Entre los equivalentes de oxaliplatino conocidos en el estado de la técnica e incluyen, aunque sin limitarse a, cisplatino, aroplatino, lobaplatino, nedaplatino y JM-216.
- 30 Entre los “análogos de nucleótidos” se incluye el fluorouracilo (5-FU) que pertenece a la familia de fármacos terapéuticos denominados antimetabolitos basados en pirimidina, y sus equivalentes químicos. El 5-FU es un análogo de pirimidina que se transforma en diferentes metabolitos citotóxicos que se incorporan después en el ADN
- 35 o ARN induciendo de este modo una parada del ciclo celular y apoptosis. El término incluye, además, sus equivalentes químicos, es decir, profármacos, análogos o

derivados de 5-FU que producen la interrupción de la replicación del ADN y/o inhiben la progresión del ciclo celular en la fase S produciendo la desorganización del ciclo celular y consecuentemente apoptosis. Entre los equivalentes químicos del 5-FU se incluyen sus profármacos, análogos y derivados, tales como 5'-desoxi-5-fluorouridina (doxifluoridina), I-tetrahidrofuranil-5-fluorouracilo (ftorafur), capecitabina (Xeloda), S-I (MBMS-247616, que consiste en tegafur y dos moduladores, una 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina y oxonato de potasio), raltitrexed (tomudex), nolatrexed (Thymitaq, AG337), LY231514 y ZD9331, tal como se describe por ejemplo, en Papamicheal (1999) The Oncologist 4:478-487. Alternativamente, es posible emplear capecitabina, un profármaco de 5-FU que se convierte en su forma activa por la enzima específica de tumor PyNPasa siguiendo una ruta de 3 pasos enzimáticos y 2 metabolitos intermedios, 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) y 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR). La capecitabina está comercializada por Roche bajo el nombre comercial de Xeloda®.

El agente antineoplásico "leucovorina" (ácido folínico) [ácido 2-[4[[[(2-amino-5-formil]-4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]amino]benzoilo]-glutámico, sal de calcio (1:1)] con número CAS 1492-18-8, se usa en combinación sinérgica con 5-FU para mejorar la eficacia del agente quimioterapéutico. Aunque no se desea estar unido a ninguna teoría, se cree que la adición de leucovorina aumenta la eficacia del 5-FU inhibiendo la timidilato sintasa. Este compuesto se ha usado como un antídoto para proteger células normales de altas dosis del fármaco antineoplásico metotrexato y para aumentar los efectos antitumorales del 5-FU y del tegafur-uracilo. También se conoce como factor citrovorum y Wellcovorin.

En otra realización particular, es posible incluir en la composición de la invención una combinación de agentes antitumorales químicos que se usan habitualmente en el tratamiento del CCR. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de combinaciones de dichos agentes antitumorales incluyen las combinaciones FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOX/BV y XELOX/BV.

30

"FOLFOX" es una abreviatura para un tipo de terapia de combinación que se usa para tratar el cáncer, que incluye 5-FU, oxaliplatino y leucovorina.

"FOLFIRI" es una abreviatura para un tipo de terapia de combinación que se usa para tratar el cáncer que comprende, o, alternativamente que consiste esencialmente en, 5-FU, leucovorina e irinotecano.

“FOLFOX/BV” es una abreviatura para un tipo de terapia de combinación que se usa para tratar el cáncer en donde uno o más de los componentes de la composición se sustituye con un equivalente químico del mismo, por ejemplo, un equivalente de 5-FU
5 y/o oxaliplatino.

“XELOX/BV” es una abreviatura para un tipo de terapia de combinación que se usa para tratar el CCR que incluye el profármaco de 5-FU conocido como capecitabina (Xeloda) en combinación con oxaliplatino y bevacizumab. Se incluyen, además,
10 equivalentes de XELOX/BV en donde uno o más de los componentes de la composición se sustituyen con un equivalente químico del mismo, por ejemplo, un equivalente de bevacizumab y/o oxaliplatino.

Kit de la invención

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante “kit de la invención”, que comprende, por separado:

- a) una composición que comprende oxaliplatino, y
- b) una composición que comprende β -criptoxantina.

20

El término “kit”, tal como aquí se usa, se refiere a una unidad de empaquetamiento que comprende dichas composiciones a) (composición que comprende oxaliplatino) y b) (composición que comprende β -criptoxantina), o los componentes de dichas composiciones a) y b), y, opcionalmente, instrucciones para su empleo, es decir, para
25 la preparación, administración y/o dosificación de dichas composiciones. Dichas composiciones a) y b) se pueden administrar y/o dosificar de forma independiente, es decir, conjuntamente o por separado, de forma simultánea (al mismo tiempo) o secuencial (separada en el tiempo) a distintos tiempos. A modo ilustrativo, las composiciones a) y b) pueden ser administradas simultánea o secuencialmente, esto
30 es, a tiempos distintos con intervalos constantes o variables, en la misma región o en regiones distintas del cuerpo, por la misma vía de administración o por vías de administración diferentes, y, en cualquier orden, es decir, puede administrarse primero la composición a) y luego la composición b) o viceversa.

35 El kit de la invención permite la administración conjunta o separada, simultánea o secuencial, de dichas composiciones a) y b).

Preferiblemente, los intervalos de administración (en el caso de una administración secuencial) o las vías de administración (en el caso de una administración separada) se eligen de tal forma que el efecto resultante sea igual o superior al de cada una de las composiciones administradas de forma separada. Preferiblemente, el uso de la composición de la invención y del kit de la invención consigue un efecto sinérgico entre ambos ingredientes activos (oxaliplatino y β -criptoxantina).

En una realización particular, una o ambas de dichas composiciones a) y b) comprende, además del ingrediente activo correspondiente (oxaliplatino o β -criptoxantina), un vehículo; en una realización particular, dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable para su administración a un sujeto, tal como se ha definido previamente en el apartado relativo a la composición de la invención.

Por tanto, en una realización particular, el kit de la invención se caracteriza porque al menos una de las composiciones a) y b) previamente definidas comprende al menos un vehículo, preferentemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable; a modo ilustrativo, la invención contempla la posibilidad de que la composición a) incluya, además de oxaliplatino, un vehículo farmacéuticamente aceptable, o bien la posibilidad de que la composición b) incluya, además de β -criptoxantina, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización particular, el kit de la invención se caracteriza porque ambas composiciones a) y b) previamente definidas comprenden al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones particulares, las composiciones a) y/o b) presentes en el kit de la invención se preparan en formas farmacéuticas de administración por vía oral, que pueden ser, por ejemplo, sólidas o líquidas, o bien en formas farmacéuticas de administración por vías diferentes a la vía oral, por ejemplo, por vía parenteral o mediante absorción a través de la mucosa o epitelio, etc. En general, se elegirán los vehículos farmacéuticamente aceptables en función de las formas farmacéuticas de administración elegidas para las composiciones a) y/o b) del kit de la invención. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de ingredientes activos, de los vehículos a utilizar, y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse, por ejemplo, en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

Cuando una o ambas composiciones a) y b) presentes en el kit de la invención incorporan un vehículo farmacéuticamente aceptable, la composición o composiciones resultantes constituyen composiciones farmacéuticas en el sentido utilizado en la presente descripción.

Las composiciones a) y b) presentes en el kit de la invención pueden presentarse en la misma forma farmacéutica de administración, por ejemplo, ambas composiciones pueden presentarse independientemente en formas farmacéuticas sólidas de administración oral, o en formas farmacéuticas líquidas de administración oral, o en formas farmacéuticas de administración parenteral (e.g., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.), etc.

Alternativamente, las composiciones a) y b) presentes en el kit de la invención pueden presentarse en distintas formas farmacéuticas de administración; a modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la composición a) puede presentarse en una forma farmacéutica sólida de administración oral y la composición b) puede presentarse en una forma farmacéutica líquida de administración oral, o viceversa; o bien la composición a) puede presentarse en una forma farmacéutica sólida o líquida de administración oral y la composición b) puede presentarse en una forma farmacéutica de administración parenteral, o viceversa; etc.

En una realización particular, al menos una de las composiciones a) o b) presentes en el kit de la invención se presenta en una forma sólida destinada a convertirse, poco antes de su uso, en una preparación en forma farmacéutica líquida para su administración por vía oral o parenteral. En otra realización particular, ambas composiciones a) y b) presentes en el kit de la invención se presentan en formas sólidas destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en unas preparaciones en formas farmacéuticas líquidas para su administración por vía oral o parenteral.

El kit de la invención también puede contener, si se desea, al menos una composición que comprende al menos un ingrediente activo adicional, diferente al oxaliplatino y a la β -criptoxantina, tal como, un agente antitumoral, por ejemplo, un agente antitumoral empleado en quimioterapia o inmunoterapia para el tratamiento del cáncer, más concretamente, en el tratamiento de un tipo de cáncer cuyas células expresan un nivel de $\Delta Np73$ superior (incrementado) al de un valor de referencia. Por tanto, en una

realización particular, el kit de la invención comprende, además de las composiciones a) y b) previamente mencionadas, al menos una composición que comprende al menos un agente antitumoral diferente al oxaliplatino y a la β -criptoxantina, tal como, por ejemplo, un agente antitumoral empleado en quimioterapia o inmunoterapia para el

5 tratamiento del cáncer, en particular, para el tratamiento de un tipo de cáncer cuyas células expresan un nivel de Δ Np73 superior (incrementado) al de un valor de referencia, tal como, por ejemplo, CCR, y, opcionalmente, un vehículo, preferentemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos ilustrativos de dicho agente antitumoral empleado en quimioterapia o inmunoterapia para el

10 tratamiento del cáncer ya han sido mencionados previamente en relación con la composición de la invención, o con la composición farmacéutica de la invención, y se incorporan aquí por referencia.

El experto en la materia entenderá que el kit de la invención puede contener, además

15 de las composiciones a) y b), tantas composiciones separadas conteniendo cada una de ellas un único agente antitumoral como agentes antitumorales diferentes se deseen incluir, o bien estos agentes antitumorales pueden estar combinados en una o varias composiciones.

20 Usos de las composiciones y kits de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de β -criptoxantina, o de una composición de la invención, o de un kit de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

25

Dentro del contexto de la presente invención, el término “cáncer” incluye cualquier tipo de cáncer o tumor. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos cánceres o tumores incluyen cánceres hematológicos (e.g., leucemias o linfomas), tumores neurológicos (e.g., astrocitomas o glioblastomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón,

30 cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (e.g., cáncer de estómago, páncreas o colorrectal (CCR)), cáncer de hígado (e.g., carcinoma hepatocelular), cáncer de células renales, tumores genitourinarios (e.g., cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), tumores óseos, tumores vasculares, etc. En una realización particular, dicho

35 cáncer es CCR.

El término “cáncer de colon” o “cáncer colorrectal” o “CCR”, tal como aquí se usa, incluye cualquier tipo de neoplasia del colon, recto y apéndice y hace referencia tanto a los adenomas tempranos y tardíos como a los carcinomas así como al cáncer hereditario, familiar o esporádico. Dentro del CCR hereditario se encuentran aquellos

5 síndromes que incluyen la presencia de pólipos, tales como los síndromes de poliposis hamartomatosos y el más conocido, la poliposis adenomatosa familiar (PAF) así como los síndromes no poliposos tales como el CCR hereditario no asociado a pólipos (CCHNP) o el síndrome de Lynch 1. Asimismo, la invención contempla el tratamiento del CCR en sus distintos estadios tales como los estadios A, B, C I, C2 y D según la

10 clasificación de Dukes, los estadios A, B1, B2, B3, C1, C2, C3 y D según la clasificación de Astler-Coller, los estadios TX, TO, Tis, TI, T2, T3, NX, NO, NI, N2, MX, MO y MI según el sistema TNM así como los estadios 0, I, II, III y IV según la clasificación de la AJCC (American Joint Committee on Cancer).

15 El término “tratamiento”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier tipo de terapia, que tenga como objetivo la terminación, mejora o reducción de la susceptibilidad a padecer una condición clínica, como se describe aquí. Así, “tratamiento”, “tratar”, y sus términos equivalentes se refieren a la obtención de un efecto deseado farmacológica o fisiológicamente, que cubre cualquier tratamiento de una afección patológica o

20 trastorno en un mamífero, incluyendo el ser humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de proporcionar prevención total o parcial de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al mismo. Es decir, "tratamiento" incluye (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo deteniendo su desarrollo, (2) interrumpir o finalizar el orden o por lo menos los síntomas asociados al mismo, por lo que el paciente ya no sufriría la

25 enfermedad o sus síntomas, por ejemplo provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas mediante la restauración o reparación de una función perdida, ausente o defectuosa, o estimular un proceso ineficiente, o (3), aminorar, aliviar o mejorar la enfermedad, o los síntomas asociados a la misma, donde aminorar se utiliza en un sentido amplio para referirse a, al menos, una reducción en la magnitud de un

30 parámetro, tal como inflamación, dolor, o deficiencia inmune.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la β -criptoxantina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino. Para su administración a

35 dicho sujeto la β -criptoxantina se formulará en una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende, además de β -criptoxantina, un vehículo

farmacéuticamente aceptable. El experto en la materia entenderá que todo lo mencionado en relación con las composiciones farmacéuticas elaboradas a partir de la composición de la invención se aplicará *mutatis mutandi* a estas composiciones farmacéuticas que comprenden β -criptoxantina y un vehículo farmacéuticamente
5 aceptable.

El término “sujeto” o “paciente”, tal como se usa aquí, incluye a cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, aunque no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates
10 no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

Como se ha mencionado previamente, tanto la composición farmacéutica de la invención, como las composiciones farmacéuticas presentes en el kit de la invención, o
15 la composición farmacéutica que comprende β -criptoxantina, se pueden administrar por cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo por vía oral, parenteral (incluyendo por vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, etc.), tópica, etc.

20 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas por los kits de la invención, o la composición farmacéutica que comprende β -criptoxantina, se administran por vía oral. En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas por los kits de la invención, o la
25 composición farmacéutica que comprende β -criptoxantina, se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o intraperitoneal. En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención, o las composiciones farmacéuticas proporcionadas por los kits de la invención, o la composición farmacéutica que comprende β -criptoxantina, se administran en una forma
30 farmacéutica de administración apropiada para su absorción a través de las mucosas o el epitelio.

En una realización particular de la invención, la administración simultánea, separada o secuencial de las composiciones farmacéuticas proporcionadas por el kit de la
35 invención puede llevarse a cabo por vías iguales o diferentes; así, por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende oxaliplatino puede administrarse por vía

parenteral (e.g., por vía intraperitoneal o intravenosa) y la composición farmacéutica que comprende β -criptoxantina puede administrarse por vía oral, o viceversa; alternativamente, la composición farmacéutica que comprende oxaliplatino puede administrarse por vía parenteral (e.g., por vía intraperitoneal o intravenosa) y la
5 composición farmacéutica que comprende β -criptoxantina puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal.

Para su aplicación en terapia, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención se encontrarán preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable
10 o sustancialmente pura, es decir, las composiciones de la invención tienen un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y sin incluir material considerado tóxico a niveles de dosificación normales.

Los ingredientes activos presentes en las composiciones farmacéuticas
15 proporcionadas por la presente invención pueden ser administrados en dosis de menos de 10 mg por kg de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 ó 0,00001 mg por cada kg de peso corporal. En una realización particular, la dosis de administración de oxaliplatino es de 1,5 mg/kg o de 3 mg/kg. La dosis unitaria se puede administrar por ejemplo por
20 inyección. En otra realización preferida la dosis de administración de oxaliplatino es de 1 mg/kg. La dosis de administración de β -criptoxantina puede ser determinada por métodos convencionales por los técnicos en la materia.

En general, la dosis a administrar depende de la severidad y respuesta de la condición
25 a tratar. La duración del tratamiento puede variar entre varios días y varios meses o hasta que se observe que la condición remite. La dosificación óptima se puede determinar realizando mediciones periódicas de las concentraciones de ingrediente o ingredientes activos en el organismo del sujeto o paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir de los valores de EC_{50} obtenidos mediante ensayos previos *in vitro*
30 o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente, menos de una vez cada 2, 4, 8 ó 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de menos cantidad que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente con dosis que oscilan entre 0,01 μ g y
35 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ó 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran,

preferiblemente, como mucho una vez cada 5, 10 ó 30 días. El tratamiento se debe continuar durante un periodo de tiempo que variará según el tipo de alteración que sufra el paciente, su severidad y el estado del paciente. Tras el tratamiento, se debe monitorizar la evolución del paciente para determinar si se debe incrementar la dosis
 5 en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o si se disminuye la dosis si se observa una mejora de la enfermedad o si se observan efectos secundarios indeseados.

En una realización particular, el sujeto que padece cáncer y que va a ser tratado con la
 10 composición, en particular, con la composición farmacéutica de la invención, o con el kit de la invención, presenta unos niveles de Δ Np73 incrementados con respecto a un valor de referencia.

El gen *p73* (cuyo ADNc corresponde en humanos a la secuencia con número de
 15 acceso Y11416 en la base de datos GenBank a fecha 3 de junio de 2013) se expresa de varias formas, diferenciándose en los extremos amino o carboxilo. Las isoformas completas contienen el dominio de transactivación en el extremo amino, pero la isoforma Δ Np73 (en humanos corresponde a la secuencia con número de acceso Q8WXG0 en la base de datos Uniprot el 10 de junio de 2013) carece de dicho dominio
 20 al comenzar la transcripción en un promotor localizado en el intrón 3, y, por tanto, no activa la transcripción desde promotores que responden a p53 pero sí inhibe la expresión de la variante completa p73 (TAp73) y de p53, actuando como un dominante negativo. De esta manera, Δ Np73 tiene funciones pro-tumorales ya que inhibe tanto la función pro-apoptótica como la supresión del crecimiento mediado por p53 y TAp73.

25 Se conocen distintos tipos de cánceres que presentan niveles incrementados de Δ Np73, tales como, por ejemplo, neuroblastoma (Casciano I. et al, 2002 Cell Death Differ. 9, 246–251), cáncer de ovario (Concin, N. et al, 2005 Clin. Cancer Res. 11, 8372–8383), cáncer de mama (Domínguez, G. et al, 2006 J. Clin. Oncol. 24, 805–815),
 30 cáncer de colon (CCR) (Domínguez, G. et al, 2006 J. Clin. Oncol. 24, 805–815), cáncer de próstata (Guan, M et al, 2005 J. Clin. Pathol. 58, 1175–1179), cáncer de tiroides (Ito, Y., et al, 2006 Pathology 38, 205–2099), cáncer de hígado (Müller, M. et al., 2005 Cell Death Differ. 12, 1564–1577), leucemia (Rizzo, M. et al., 2004, Leukemia 18, 1804–1809), cáncer de pulmón (Uramoto, H. et al., 2004 Clin. Cancer Res. 10, 6905–
 35 6911), cáncer gástrico (Vilgelm, A.E. et al., 2010 Oncogene 29, 5861–5868), cáncer de

esófago (Vilgelm, A.E. et al., 2010 Oncogene 29, 5861–5868) y cáncer de médula ósea (Zitterbart, K. et al., 2007 Acta Neuropathol. 114, 641–650), entre otros.

5 En la presente invención, el nivel de expresión de Δ Np73 se mide en una muestra del sujeto que padece cáncer.

El término “muestra”, tal como aquí se usa, se refiera al material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para determinar el nivel de expresión de Δ Np73. La muestra puede aislarse de
10 cualquier fluido o tejido biológico adecuado, por ejemplo, tejido tumoral, sangre, plasma, suero, orina, etc.

En una realización particular, la muestra es una muestra de tejido tumoral o una muestra de exosomas.

15

La expresión “muestra de tejido tumoral”, tal como aquí se usa, se refiere a una muestra de tejido procedente del tumor primario del cáncer, por ejemplo, CCR. La muestra de tejido tumoral se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante biopsia, utilizando métodos bien conocidos para los expertos en las
20 técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen partición en trozos grandes de un tumor, o microdissección u otros métodos de separación de células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en
25 formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

Los términos “exosomas” o “ectosomas” y “micropartículas”, tal como aquí se usan, se
30 refieren a vesículas de aproximadamente 50-90 nm de diámetro de origen endocítico secretadas al medio extracelular por todas las células.

La identificación de una vesícula como exosoma requiere cumplir diversos criterios que conoce un experto en la materia. Su tamaño varía de 50 a 90 nm de diámetro y
35 después de una tinción negativa muestra una morfología en forma de copa por microscopía electrónica. El análisis bioquímico y proteómico en exosomas purificados

confirma la presencia de proteínas citosólicas tales como Hsc73 y Hsc90, subunidades de proteínas G triméricas, Tsg101, varias anexinas, Rab guanosina trifosfato, proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina) y glóbulos de grasa láctea (MFG)-E8 (o lactoadhesina), proteínas unidas a la membrana como tetraspanin (CD9, CD63, CD81, CD82) y moléculas MHC de clase I. Los exosomas también presentan proteínas celulares específicas de tipo, tales como MHC de clase II y moléculas co-estimuladoras (CD86) en las células presentadoras de antígeno (APC), factor de von Willebrand o CD41a (GPIIb) sobre las plaquetas, TCR en exosomas derivados de células T y perforina o granzima en CTL. La composición de lípidos de los exosomas revela un enriquecimiento en colesterol, esfingomielina y gangliósido GM3 niveles. En total, esta composición específica distingue a los exosomas de cuerpos apoptóticos o de otras vesículas.

Un experto en la materia conoce diversos métodos que pueden emplearse para obtener exosomas y analizarlos en una muestra. Preferiblemente, los exosomas son aislados de manera no invasiva mediante una extracción rutinaria de sangre periférica. Preferiblemente, es aconsejable adaptar los protocolos de obtención de exosomas conocidos a la densidad característica de la sangre, por ejemplo tal y como los protocolos descritos en Théry C. et al., Current Protocols in Cell Biology Unit 3.22 April 2006. Entre los métodos conocidos que pueden emplearse para el aislamiento de exosomas se encuentra la centrifugación diferencial, mediante un colchón de sucrosa (gradiente de sacarosa) al 30 % o mediante inmunoaislamiento. Adicionalmente es posible emplear kits disponibles comercialmente tal y como el kit "Total Exosome Isolation (from serum) de Invitrogen™.

25

Una vez obtenida la muestra del sujeto es necesario determinar el nivel de expresión de Δ Np73.

El término "nivel de expresión" de un gen, tal como aquí se usa, se refiere a la cantidad medible de producto del gen en una muestra del sujeto, en el que el producto del gen puede ser un producto de la transcripción o un producto de la traducción de dicho gen. En consecuencia, el nivel de expresión puede corresponder a un ácido nucleico del gen (tal como ARNm o ADNc) o un polipéptido codificado por dicho gen. El nivel de expresión se deriva de la muestra de un sujeto y/o de una muestra o muestras de referencia, y puede ser detectado *de novo* o corresponder a una determinación anterior.

En una realización particular, la cuantificación del nivel de expresión de Δ Np73 puede llevarse a cabo mediante la cuantificación del nivel de expresión de la proteína Δ Np73, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína Δ Np73, o bien
5 mediante la determinación de la actividad de la proteína Δ Np73, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

El nivel de expresión de la proteína Δ Np73 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra
10 de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse Δ Np73 (o a fragmentos de la misma que contengan un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de
15 marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre
20 estas técnicas se incluyen, a modo ilustrativo, no limitativo, Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de
25 proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína Δ Np73, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína Δ Np73 con alta afinidad para
30 detectar la cantidad de la misma. Sin embargo, se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. En el mercado, existen anticuerpos comerciales contra la proteína Δ Np73 que pueden emplearse en el
35 contexto de la presente invención. Son múltiples las casas comerciales que ofrecen

anticuerpos frente a la proteína Δ Np73 (anticuerpos anti- Δ Np73), tales como Abcam, Gene Tex Acris Antibodies o Genway Biotech Inc., entre otros.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína Δ Np73 se realiza mediante western blot, ELISA o mediante un array de proteínas.

Alternativamente, es posible detectar cualquier variante funcionalmente equivalente de la proteína Δ Np73.

10 En el contexto de la presente invención, el término “variante funcionalmente equivalente de la proteína Δ Np73” incluye (i) variantes de la proteína Δ Np73 en las que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado), en donde tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser
15 uno codificado por el código genético, así como (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos y que desempeñan la misma función que la proteína Δ Np73, es decir, ser capaz de inhibir la expresión de p53 y TAp73.

20 Variantes de la proteína Δ Np73 de acuerdo con la presente invención, pueden identificarse usando métodos conocidos por un experto en la materia basados en analizar el efecto en el crecimiento celular (Ishimoro O. et al., Cancer Research 62, 636-641, February 1, 2002) o analizando la inhibición de la apoptosis inducida por p73 (Nakagawa T. et al., Mol Cell Biol. 2002 April; 22(8): 2575–2585; Soldevilla B. et al.,
25 Clin Cancer Res. 2011 Sept; 17(18): 6029-6039). Adicionalmente es posible identificar variantes de la proteína Δ Np73 mediante el análisis de la represión de p21 /CDKN1A o la modulación de la expresión de diversos genes, por ejemplo, la sobreexpresión de EGR1 y CDC6 o la represión de c-MYC, NF κ B1, tal y como describen Kartasheva y col. (Kartasheva NN. et al., Oncogene. 2003 Nov 13;22(51):8246-54).

30

Las variantes según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de Δ Np73 de, al menos, el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el
35 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y las secuencias específicas de proteína Δ Np73 definidas anteriormente se determina

usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-
5 410 (1990)].

Preferiblemente dichas variantes carecen del dominio de transactivación al igual que la proteína $\Delta Np73$. El dominio de transactivación corresponde a los aminoácidos 1-62 de la proteína $p73$ que en humanos tiene la secuencia con número de acceso O15350 de
10 la base de datos Uniprot a fecha 3 de junio de 2013.

En otra realización particular, la cuantificación del nivel de expresión de $\Delta Np73$ se lleva a cabo a partir del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ (ARNm de $\Delta Np73$), es decir, el ARN resultante de la transcripción del gen $p73$ que codifica la isoforma $\Delta Np73$, o,
15 alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho ARNm. Por simplicidad, en ocasiones, mediante la expresión " $\Delta Np73$ ", se incluye tanto el ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ como el ADNc correspondiente a dicho ARNm. Por tanto, en una realización particular, la cuantificación del nivel de expresión de $\Delta Np73$ comprende la cuantificación del ARNm que contiene la secuencia que codifica la
20 isoforma $\Delta Np73$ del gen $p73$, o un fragmento de dicho ARNm, o la cuantificación del ADNc de dicho ARNm, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

Para ello, la muestra biológica puede ser tratada para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares
25 en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente (Sambrook, J., et al., "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.)

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la presente invención para detectar y cuantificar el nivel del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, el nivel de ARNm codificado por dicho gen puede ser cuantificado mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del
30 ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de
35

sondas apropiadas, northern blot y el empleo de sondas específicas del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc., preferentemente, mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando un marcador apropiado. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dicho ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ también pueden ser cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001. (citado *ad supra*).

Estos métodos son conocidos y una persona experta en la materia estará familiarizada con las normalizaciones necesarias para cada técnica. Por ejemplo, las medidas de expresión generadas utilizando la PCR multiplex deben ser normalizadas mediante la comparación de la expresión del gen que se mide con los llamados genes "housekeeping", la expresión de los cuales debe ser constante en todas las muestras, proporcionando así una expresión basal para comparar, o con otros genes control cuya expresión se conoce que es modulada con el cáncer.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión de $\Delta Np73$ se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un array de ADN o ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos a partir del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ o de su ADNc correspondiente.

Una vez determinados los niveles de $\Delta Np73$ en una muestra de un sujeto con cáncer es necesario comparar con un valor de referencia para saber si dichos niveles se encuentran incrementados en dicha muestra.

El término "valor de referencia", tal como aquí se usa, se refiere a un valor obtenido en el laboratorio y utilizado como referencia para los valores o datos obtenidos mediante exámenes de laboratorio de los pacientes o muestras recogidas de pacientes. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor de la mediana, un valor medio, o un valor en comparación a un control determinado o valor de referencia. El valor de referencia puede estar basado en un

valor de la muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está siendo probada, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede estar basado en un gran número de muestras, como los valores de la población de sujetos del mismo grupo de edad, o puede estar basado en un conjunto de
5 muestras, incluyendo o excluyendo la muestra a ensayar.

En una realización, el valor de referencia, tal como aquí se entiende, puede representar cantidades absolutas de $\Delta Np73$. En otra realización, el nivel de expresión se puede determinar directamente en relación con el valor de referencia (por ejemplo,
10 en términos de aumento o disminución, o aumento o disminución de número de veces).

En una realización preferida, el valor de referencia es el nivel de expresión del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$, o de su ADNc, en una muestra control o muestra de
15 referencia. Dependiendo del tipo de tumor a analizar, la naturaleza exacta del control o muestra de referencia puede variar. Dicha muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados. En tales muestras, las concentraciones normales
20 (de referencia) del biomarcador se pueden determinar, por ejemplo proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un
25 grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad. La colección de muestras de las que deriva el nivel de referencia estará preferiblemente constituida por sujetos que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente objeto de estudio.

30

En una forma de realización particular, los valores de referencia para expresión "incrementada" de la expresión de $\Delta Np73$ se determinan calculando los percentiles por medios convencionales que implica ensayar en una o varias muestras aisladas de sujetos en los que la enfermedad se encuentra bien documentada por alguno de los
35 métodos mencionados anteriormente los niveles de expresión de $\Delta Np73$. Los niveles de expresión "incrementados" de $\Delta Np73$ se pueden entonces asignar, preferiblemente,

a muestras en donde los niveles de expresión de $\Delta Np73$ son iguales a o superan el percentil 50 en la población normal, incluyendo, por ejemplo, niveles de expresión iguales a o en exceso al percentil 60 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 70 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 80 en la población normal, iguales a o en exceso al percentil 90 en la población normal, e iguales a o en exceso al percentil 95 en la población normal.

En una realización particular, el sujeto que va a ser tratado según la presente invención presenta niveles de $\Delta Np73$ incrementados.

10

La expresión "nivel de expresión incrementado" en el sentido utilizado en esta descripción, indica que el nivel de expresión de $\Delta Np73$ es superior al valor de referencia. En particular, se puede considerar que una muestra presenta un nivel incrementado de expresión de $\Delta Np73$ con respecto a un valor de referencia cuando el nivel de expresión en la muestra del sujeto es, al menos, 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, o incluso más, con respecto al valor de referencia.

15

Métodos de la invención

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar una terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto, en adelante "primer método de la invención", que comprende

25

- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
- ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

30

en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina.

En una realización particular del primer método de la invención dicha terapia que comprende β -criptoxantina comprende únicamente la administración de β -criptoxantina. En otra realización particular del primer método de la invención dicha terapia que comprende β -criptoxantina comprende la administración de β -criptoxantina y, además, la administración de un agente antitumoral, tal como un agente antitumoral

35

empelado en quimioterapia o inmunoterapia en el tratamiento del cáncer. Ejemplos ilustrativos de dichos agentes antitumorales se han mencionado previamente en relación con la composición de la invención o con la composición farmacéutica de la invención. En una realización particular, dicho agente antitumoral es un agente a base
5 de platino, tal como, por ejemplo, oxaliplatino. Los ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que la combinación de β -criptoxantina y oxaliplatino permite reducir la dosis de oxaliplatino a administrar al sujeto que padece cáncer.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar una terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto y que está siendo tratado con oxaliplatino, en adelante "segundo método de la invención", que comprende:

- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
- 15 ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina para su administración a dicho sujeto que padece un cáncer y que está siendo tratado
20 con oxaliplatino.

De acuerdo con el segundo método de la invención, se selecciona una terapia a base de β -criptoxantina para su administración a un sujeto que padece cáncer y que está siendo sometido a tratamiento con oxaliplatino, si presenta un nivel de expresión de
25 $\Delta Np73$ incrementado con respecto al valor de referencia; en este caso, la administración de β -criptoxantina a dicho sujeto potenciaría el efecto antitumoral mediado por el oxaliplatino y/o permite reducir la dosis de oxaliplatino a administrar al sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino, lo que disminuiría los efectos secundarios asociados al empleo de dosis más altas de oxaliplatino.

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece cáncer para una terapia que comprende β -criptoxantina, en adelante "tercer método de la invención", que comprende:

- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho
35 sujeto, y

- ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona dicho paciente para dicha terapia que comprende β -criptoxantina.

En una realización particular del tercer método de la invención dicha terapia que comprende β -criptoxantina comprende únicamente la administración de β -criptoxantina. En otra realización particular del tercer método de la invención dicha terapia que comprende β -criptoxantina comprende la administración de β -criptoxantina y, además, la administración de un agente antitumoral, tal como un agente antitumoral empelado en quimioterapia o inmunoterapia en el tratamiento del cáncer. Ejemplos ilustrativos de dichos agentes antitumorales se han mencionado previamente en relación con la composición de la invención o con la composición farmacéutica de la invención. En una realización particular, dicho agente antitumoral es un agente a base de platino, tal como, por ejemplo, oxaliplatino. Los ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que la combinación de β -criptoxantina y oxaliplatino permite reducir la dosis de oxaliplatino a administrar al sujeto que padece cáncer.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para una terapia que comprende β -criptoxantina, en adelante "cuarto método de la invención", que comprende:

- i) determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra procedente de dicho sujeto, y
- ii) comparar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,

en donde si el nivel de expresión de $\Delta Np73$ está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona dicho sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para dicha terapia que comprende β -criptoxantina.

De acuerdo con el cuarto método de la invención, se selecciona un sujeto que padece cáncer y que está siendo sometido a tratamiento con oxaliplatino para que reciba una terapia a base de β -criptoxantina, si dicho sujeto presenta un nivel de expresión de $\Delta Np73$ incrementado con respecto al valor de referencia; en este caso, la

administración de β -criptoxantina a dicho sujeto potenciaría el efecto antitumoral mediado por el oxaliplatino y/o permite reducir la dosis de oxaliplatino a administrar al sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino, lo que disminuiría los efectos secundarios asociados al empleo de dosis más altas de oxaliplatino.

5

Los métodos de la invención [primer método de la invención, segundo método de la invención, tercer método de la invención y cuarto método de la invención] comprenden en un primer paso [etapa i)] determinar el nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra de dicho sujeto. Los términos “nivel de expresión”, “ $\Delta Np73$ ”, “muestra” y “sujeto” ya
10 han sido definidos previamente en detalle en relación con los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia, y son igualmente aplicables a los métodos de la invención.

El nivel de expresión de $\Delta Np73$ en una muestra puede determinarse tal como se ha
15 mencionado previamente en relación con los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

En una realización particular, el nivel de expresión de $\Delta Np73$ se determina
20 cuantificando el nivel de la proteína $\Delta Np73$, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, tal como se ha indicado previamente en relación con los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. En una realización preferida, el nivel de expresión de $\Delta Np73$ se cuantifica por medio de un ensayo inmunológico mediante el empleo de un
25 anticuerpo que reconoce $\Delta Np73$, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En otra realización particular, el nivel de expresión de $\Delta Np73$ se determina
cuantificando el nivel del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$ (ARNm de $\Delta Np73$), o
30 de un fragmento de dicho ARNm, o cuantificando el nivel de ADNc de dicho ARNm, o de un fragmento de dicho ADNc. En una realización preferida, el nivel de expresión de $\Delta Np73$ se cuantifica por medio de una PCR cuantitativa o por medio de una matriz de ADN o de ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos a partir de dicho ARNm o ADNc correspondiente.

35

En la etapa ii), los métodos de la invención [primer método de la invención, segundo método de la invención, tercer método de la invención y cuarto método de la invención] comprenden comparar el nivel de expresión de ΔNp73 en la muestra del sujeto obtenido en la etapa i) con un valor de referencia y, si el nivel de expresión de ΔNp73 en dicha muestra está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces:

- 5 - se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina para su administración a un sujeto que padece cáncer [primer método de la invención];
10 o
- se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina para su administración a dicho sujeto que padece un cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino; o
15
- se selecciona dicho sujeto que padece cáncer para una terapia que comprende β -criptoxantina; o
- se selecciona dicho sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para una terapia que comprende β -criptoxantina.
20

El término “valor de referencia” así como el significado de nivel de expresión “incrementado” aplicado a ΔNp73 ya han sido definidos previamente en detalle en relación con los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia, y son igualmente aplicables a los métodos de la invención. Asimismo, la manera de comparar el nivel de expresión de ΔNp73 obtenido en la muestra del sujeto con el valor de referencia también ha sido descrito en detalle en relación con los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia, y es aplicable a los métodos de la invención.

En realizaciones particulares de dichos métodos de la invención [primer método de la invención, segundo método de la invención, tercer método de la invención y cuarto método de la invención] dicho cáncer es un tipo de cáncer caracterizado porque sus células muestran un nivel incrementado de ΔNp73 con respecto a un valor de

referencia. El experto en la materia puede identificar fácilmente si las células de un determinado tipo de cáncer exhiben un nivel de expresión de $\Delta Np73$ incrementado (superior, mayor o más alto que) con respecto a un valor de referencia por métodos convencionales, conocidos por los técnicos en la materia, para cuantificar el nivel de expresión de $\Delta Np73$, tales como los métodos descritos en la presente descripción, basados en la cuantificación del nivel de la proteína $\Delta Np73$ o del ARNm que codifica la isoforma $\Delta Np73$, o del ADNc correspondiente. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos tipos de cáncer cuyas células muestran un nivel incrementado de $\Delta Np73$ con respecto a un valor de referencia incluyen cáncer colorectal (CCR), cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de médula ósea, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, leucemia, o neuroblastoma. En una realización concreta, dicho cáncer es CCR.

En una realización particular, la β -criptoxantina se administra por vía oral o parenteral.

15

En otra realización particular, el oxaliplatino se administra por vía oral o parenteral.

En otra realización particular, el oxaliplatino y la β -criptoxantina se administran conjuntamente. En otra realización particular, el oxaliplatino y la β -criptoxantina se administran separadamente. En otra realización particular, el oxaliplatino y la β -criptoxantina se administran simultáneamente. En otra realización particular, el oxaliplatino y la β -criptoxantina se administran secuencialmente, de forma separada en el tiempo, en cualquier orden.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto en necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de β -criptoxantina, o de una composición que comprende oxaliplatino y β -criptoxantina, o de (i) una composición que comprende oxaliplatino y (ii) una composición que comprende β -criptoxantina.

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto sometido a tratamiento con oxaliplatino, en necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de β -criptoxantina.

35

Las características de dichas composiciones así como del cáncer ya han sido mencionadas previamente y se incorporan aquí por referencia.

La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se
5 deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

En los Ejemplos se han utilizado los Materiales y Métodos que se describen a
10 continuación.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

15

Las distintas líneas celulares utilizadas fueron compradas a la American Type Culture Collection (ATCC) y crecidas en monocapa en medio DMEM o RPMI (Lonza Group Ltd., Switzerland) suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 4 mmol/L y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina). Las células SW480-
20 ADH son una subpoblación derivada de la línea celular SW480 (Aguilera y col. Carcinogenesis 28: 1877-1884, 2007).

Preparación de la solución de β-criptoxantina

25 Se preparó una solución stock de β-criptoxantina (5 mmol/L) disolviendo la β-criptoxantina comprada en polvo (Extrasynthese, Lyon, France) en tetrahidrofurano (THF). Esta solución se conserva a -20°C.

Tratamiento de las células con β-criptoxantina

30

Las soluciones stock de β-criptoxantina se descongelaron y se añadieron a la concentración final deseada a las placas donde crecían las células. Se tuvo en cuenta que la concentración final de THF en la placa de cultivo fuera de 0,2% v/v, para que no resultara tóxico. Las células en los experimentos controles (donde no se añadía β-
35 criptoxantina) recibieron solo THF. Las células se sembraron en placas convencionales de cultivo de 6 pocillos (2×10^5 células/pocillo) y se comenzó el

tratamiento al día siguiente para permitir que las células se adhirieran a la placa. Posteriormente las células se trataron con medio suplementado con β -criptoxantina o THF. El medio celular fue renovado cada 24 horas. Todo este proceso se llevó a cabo en la oscuridad, ya que la β -criptoxantina es sensible a la luz.

5

Extracción de β -criptoxantina de las células y análisis de sus niveles por cromatografía líquida de ultra alta resolución (U-HPLC)

Tras el tratamiento con β -criptoxantina, el medio de cultivo se recogió, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS. 20 μ L de la suspensión se utilizaron para conteo del número total de células (ADAM Cell counter, Digital Bio). La β -criptoxantina del medio y la β -criptoxantina intracelular se determinaron mediante U-HPLC (Granado y *col.*, Anal Bioanal Chem 397: 1389-1393, 2010).

15 Extracción de ARN, retro-transcripción y PCR array. Validación por RT-PCR

El ARN total fue extraído siguiendo el protocolo del TRIsure reagent (Bioline) y cuantificado mediante el empleo de un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop, Wilmington, DE). Para la síntesis de la primera hebra de ADNc, 400 ng de ARN fueron retro-transcritos mediante el kit Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems). Se utilizaron hexámeros aleatorios (“random”) como cebadores para esta síntesis de ADNc.

Para el ensayo de los PCR arrays se utilizaron los PCR arrays “RT2 Profiler DNA damage signaling pathway PCR array” (PAHS-029, SABiosciences, CA) y “RT2 Profiler p53 signaling pathway PCR array” (PAHS-027, SABiosciences, CA). Los datos se analizaron con el software que proporciona SABiosciences.

Para los ensayos de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real) se ha utilizado el kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l que contenía 2 μ l de ADNc, 0,5 μ M de cada cebador (primer) y 1x de mezcla incluida en el kit.

Los cebadores para TAp73 y Δ Np73 y sus condiciones han sido descritos con anterioridad (Dominguez y *col.*, J Clin Oncol. 24: 805-815, 2006). La expresión del gen

35

SDHA (succinato dehidrogenasa) ha sido utilizada para normalizar los niveles de expresión.

Transfecciones

5

Para forzar la expresión de Δ Np73, las células fueron transfectadas con un plásmido pcDNA que contenía a Δ Np73 (Soldevilla et al., Clin Cancer Research 17(18):6029-39, 2011) usando lipofectamina 2000 (Invitrogen); como control se ha utilizado el vector vacío (Soldevilla et al., Clin Cancer Research 17(18):6029-39, 2011).

10

Ensayos de apoptosis

Las células se crecieron en placas de 24 pocillos. Tras 24 horas para permitir la adhesión de las células, estas fueron pre-tratadas con β -criptoxantina durante 12-24
15 horas. Posteriormente, las células se trataron durante 48 horas con oxaliplatino en el caso del tratamiento combinado. En el caso del tratamiento individual con el quimioterápico, las células fueron pretratadas con el vehículo durante 12-24 horas y posteriormente con oxaliplatino durante 48 horas. El medio se renovó cada 24 horas. Finalmente, las células adheridas y las que flotaban en el medio fueron recolectadas y
20 evaluadas por citometría de flujo utilizando anexina V- FITC/PI (BD Pharmigen).

Ensayo MTT de viabilidad y proliferación celular

Para este ensayo las células se crecieron en placas de 96 pocillos. Tras dejar que se
25 adhirieran, se trataron como se ha descrito en el apartado anterior. Tras los tratamientos, se testó la viabilidad celular mediante un ensayo MTT (Cayman Chemical Company) siguiendo el protocolo suministrado por esta compañía. Para el ensayo de proliferación a las 24 horas, una vez que se adhirieron a la placa, las células se trataron con β -criptoxantina 10 μ M durante 3, 6, 8 y 10 días. En los
30 experimentos en los que se testó el efecto del oxaliplatino, éste se añadió 48 horas antes de la finalización del experimento.

Ensayos en animales de experimentación

35 Todos los experimentos se han llevado a cabo siguiendo las regulaciones del Comité de Bienestar Animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Madrid,

España). Se inyectaron subcutáneamente 1×10^6 células HCT-116 (células de carcinoma de colon humano) en 20% de matrigel a ratones inmunodeprimidos (Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu mice, hembras, 5 semanas de edad, Harlan Laboratories). El tamaño de los tumores formados se midió con un calibre. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula [1]

$$V=0,5ab^2 \quad [1]$$

donde 'a' y 'b' indican el diámetro mayor y menor, respectivamente.

10

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño comprendido entre 75 mm^3 y 150 mm^3 , fueron asignados arbitrariamente en 4 grupos (7 ratones por grupo). Uno de los grupos fue tratado con vehículo (THF, 0,2% v/v) y un segundo grupo recibió β -criptoxantina ($10 \mu\text{M}$) como único tratamiento. El tercer y el cuarto grupo, a los que se administró oralmente vehículo (0,2% v/v) o β -criptoxantina ($10 \mu\text{M}$), comenzaron el tratamiento con oxaliplatino (3 mg/kg) cuando el tamaño tumoral alcanzó los $250\text{-}300 \text{ mm}^3$. El vehículo (THF, 0,2% v/v) o la β -criptoxantina ($10 \mu\text{M}$) fueron administrados por vía oral diariamente durante todo el tratamiento. El oxaliplatino se administró intraperitonealmente durante 5 días, seguido de 5 días de descanso (el vehículo o la β -criptoxantina se siguieron administrando durante el periodo de descanso). Se repitió este ciclo dos veces.

20

En un experimento adicional, un grupo de ratones se trató con β -criptoxantina por vía intraperitoneal junto con una dosis de 1,5 mg/kg (5 ratones) o de 3 mg/kg (5 ratones) de oxaliplatino (i.p.) para comprobar el efecto de la β -criptoxantina por esta vía de administración. El grupo de ratones control fueron tratados con oxaliplatino a ambas dosis y vehículo administrado intraperitonealmente.

25

Análisis de toxicidad

30

Para determinar la toxicidad de los diferentes tratamientos se realizó un seguimiento del peso de los animales a lo largo del tratamiento y el análisis de diferentes parámetros bioquímicos (creatinina, bilirrubina, albúmina, gamma-glutamíntransferasa, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT))

35

Análisis estadístico

Las diferencias entre condiciones experimentales han sido evaluadas usando el test T-Student. En los estudios con animales, los resultados se representan como la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El test de Levene se ha utilizado para calcular la igualdad de varianzas. Valores de dos colas de $p \leq 0,05$ se han considerado estadísticamente significativas. Los análisis se han llevado a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS version 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

EJEMPLO 1

Incorporación de β -criptoxantina y efectos en la expresión génica

Inicialmente, los inventores confirmaron, mediante U-HPLC, que la línea celular de cáncer de colon HCT-116 expuesta a β -criptoxantina incorporaba este caroteno en su interior celular (Tabla 1).

Tabla 1

Incorporación neta de β -criptoxantina a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento en células HCT-116. Cuantificación llevada a cabo por U-HPLC

ng β -criptoxantina/ 10^6 células		
24 h	48 h	72 h
35,440 \pm 0,256	118,903 \pm 0,362	175,160 \pm 0,256

Posteriormente, se ha evaluado si la incorporación de β -criptoxantina en las células HCT-116 modificaba la expresión génica de las mismas y si esto se traducía en cambios en sus funciones. Para ello, se realizaron una serie de experimentos utilizando 2 PCR arrays distintos tal como se ha indicado previamente [“RT2 Profiler p53 signaling pathway PCR array” y “RT2 Profiler DNA damage signaling pathway PCR array”] distintos con el fin de evaluar cambios en la expresión génica en estas células tras el tratamiento con β -criptoxantina. Uno de los PCR arrays contiene genes de la ruta de *TP53* y el segundo incluye genes implicados en la señalización en respuesta a daño genómico. Ambos PCR arrays mostraron que las células de HCT-116 aumentaban significativamente los niveles de *TP73* después del tratamiento con β -criptoxantina (entre 3 y 10 veces).

Seguidamente, se profundizó en el estudio evaluando en ésta y en otras líneas celulares de cáncer de colon cómo afectaba el tratamiento con β -criptoxantina a las 2 principales variantes de TP73: TAp73 y Δ Np73. En la línea HCT-116 el tratamiento con β -criptoxantina condujo a un aumento entre 2 y 5 veces en los niveles de TAp73, la isoforma con función anti-tumoral; sin embargo, respecto a la variante con función pro-tumoral, Δ Np73, se observó una disminución en su expresión de entre 3 y 4 veces (Figura 1).

Se obtuvieron resultados similares para las células de cáncer de colon SW480-ADH y SW1417. Los niveles de TAp73 se incrementaron, tras ser expuestas las células a β -criptoxantina, entre 2 y 17 veces en la línea SW480-ADH. No se observaron diferencias para la línea SW1417. Por el contrario, en ambas líneas celulares los niveles de Δ Np73 disminuyeron tras el tratamiento con β -criptoxantina entre 2 y 6 veces (Figura 1).

Soldevilla y col. (Soldevilla et al., Clin Cancer Research 17(18):6029-39, 2011) han descrito que la sobreexpresión de Δ Np73 en esas mismas líneas celulares de cáncer de colon, induce resistencia a oxaliplatino. Así, en esas líneas celulares de cáncer de colon en las que la β -criptoxantina disminuye los niveles de Δ Np73, se evaluó si eso se traducía en una mayor sensibilidad a la muerte celular inducida por oxaliplatino. En este sentido, los experimentos y resultados que se describen a continuación se centran en evaluar si el tratamiento combinado de oxaliplatino y β -criptoxantina produce un mayor muerte celular (evaluada como porcentaje de muerte celular inducida y porcentaje de células viables) que el tratamiento con oxaliplatino de forma aislada.

EJEMPLO 2

Aumento de la inducción de muerte celular por el tratamiento combinado oxaliplatino más β -criptoxantina vs el tratamiento con oxaliplatino de forma aislada

El tratamiento de las células HCT-116 con oxaliplatino 100 μ M dio como resultado un porcentaje de muerte celular, mediante apoptosis, del 68,17%. El tratamiento combinado de esa dosis de oxaliplatino junto con β -criptoxantina a una concentración de 10 μ M incrementó el porcentaje de muerte celular en un 9,44% ($p=0,07$) (Figura 2). Se obtuvieron resultados similares con las otras 2 líneas celulares de cáncer de colon

(SW480-ADH y SW1417). El oxaliplatino produjo la muerte del 31,97% en las células SW480-ADH, mientras que el tratamiento combinado con β -criptoxantina aumentó el porcentaje de muerte celular de dichas células en un 24,04% ($p=0,0024$) (Figura 2). En las células SW1417, la muerte inducida por oxaliplatino fue del 37,07% y el tratamiento combinado llevó hasta unos porcentajes de muerte celular del 49,08% ($p=0,014$), un 12% más (Figura 2).

EJEMPLO 3

Disminución de la viabilidad celular por el tratamiento combinado oxaliplatino más β -criptoxantina vs el tratamiento con oxaliplatino de forma aislada

La viabilidad celular fue evaluada por una técnica distinta a la utilizada para analizar la muerte celular en el Ejemplo 2; no obstante, con ambas aproximaciones, se obtuvieron resultados similares. En las células HCT-116 la viabilidad celular después del tratamiento con oxaliplatino fue del 42,5%. El tratamiento combinado con β -criptoxantina redujo esta viabilidad al 35,84% ($p=0,004$). En las células SW480-ADH la exposición a oxaliplatino disminuyó la viabilidad celular a un 77,31%. El tratamiento combinado redujo la viabilidad en un 15% más ($p=0,04$). En las células SW1417 el oxaliplatino redujo la viabilidad celular a un 88,1%, mientras que el tratamiento combinado con β -criptoxantina redujo la viabilidad en un 20,83% más ($p=0,009$) (Figura 3).

Para las células HCT-116 se llevó a cabo también el tratamiento utilizando la mitad de la dosis de oxaliplatino (50 μ M). Esta dosis de oxaliplatino combinada con β -criptoxantina 10 μ M indujo el mismo porcentaje de muerte celular que la dosis de 100 μ M de oxaliplatino utilizada de manera aislada (Figura 4).

Resultados similares se obtuvieron cuando el mismo experimento se llevó a cabo a los 8 y 10 días. Llamativamente, a estos tiempos de exposición, la β -criptoxantina por sí sola presenta efecto antiproliferativo (Figura 5).

EJEMPLO 4

β -criptoxantina coopera con oxaliplatino en la inducción de muerte celular y disminución de viabilidad celular en células de cáncer de colon a través de la regulación negativa de Δ Np73

Las células de las líneas celulares HCT-116 y SW480-ADH fueron modificadas para que sobreexpresaran Δ Np73. En estas células no se observó que el tratamiento combinado de oxaliplatino junto con β -criptoxantina aumentara la inducción de muerte celular ni disminuyera la viabilidad celular. Estos datos apoyan que cuando de manera artificial la adición de β -criptoxantina no puede disminuir los niveles de Δ Np73 porque se ha forzado su expresión, no se observa el efecto esperado del tratamiento combinado, lo que indica que el mecanismo de actuación de β -criptoxantina es, al menos en parte, a través de la disminución de los niveles de Δ Np73 (Figura 6).

10

EJEMPLO 5

Ensayos en animales de experimentación

Los datos obtenidos en ensayos en animales apoyan los resultados que se han obtenido en los sistemas celulares *in vitro*.

15

Se trataron ratones desnudos con oxaliplatino (3 mg/kg) de manera aislada o combinando esa dosis de oxaliplatino con β -criptoxantina 10 μ M suministrada por vía oral a los animales (el oxaliplatino se administró siempre por vía intraperitoneal). El tratamiento combinado del oxaliplatino con la β -criptoxantina redujo el crecimiento tumoral más que el tratamiento con oxaliplatino administrado de forma aislada tanto al final del primer ciclo como al final del segundo ciclo ($p < 0,05$). Además, se observó que la β -criptoxantina administrada de forma aislada reducía el crecimiento tumoral respecto al vehículo ($p < 0,05$) (Figura 7).

25

Este mismo experimento se ha llevado a cabo suministrando la β -criptoxantina a los ratones por vía intraperitoneal. En esta aproximación, el tratamiento combinado del oxaliplatino con la β -criptoxantina redujo el crecimiento tumoral más que el tratamiento con oxaliplatino administrado de forma aislada al final del primer ciclo de tratamiento (Figura 8). Se observaron resultados similares cuando se inyectaban a los ratones 1,5 mg/kg de oxaliplatino (Figura 9).

30

Llamativamente, la inducción de muerte celular tras exposición a 3 mg/kg y 1,5 mg/kg de oxaliplatino fue similar aunque inferior a la muerte celular inducida por el tratamiento combinado de oxaliplatino (1,5 mg/kg) junto con β -criptoxantina (Figura 10), lo que apoya el hecho de que dosis más pequeñas de oxaliplatino combinadas con β -criptoxantina podrían desencadenar la misma parada de crecimiento tumoral

35

que dosis más altas (dobles, en este caso) de oxaliplatino utilizadas de manera aislada, con el consecuente beneficio (en cuanto a efectos secundarios se refiere) para los pacientes.

- 5 Al final del estudio *in vivo* se analizaron los niveles de ARNm de $\Delta Np73$ en el tumor y se confirmó que la β -criptoxantina regula negativamente la expresión de $\Delta Np73$ *in vivo* (Figura 11).

- Para evaluar la toxicidad de los diferentes tratamientos se realizó un seguimiento del
- 10 peso de los ratones a lo largo del tratamiento y no se observaron diferencias significativas antes ni después de los diferentes tratamientos. Además, al final del tratamiento se realizó un análisis bioquímico de diferentes parámetros: creatinina, bilirrubina, albúmina, gamma-glutamyltransferasa, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). No se observaron diferencias significativas de estos
 - 15 parámetros entre los diferentes grupos (Figura 12).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende β -criptoxantina y oxaliplatino.
- 5 2. Un kit que comprende a) una composición que comprende β -criptoxantina y b) una composición que comprende oxaliplatino.
3. Uso de β -criptoxantina, o de una composición según la reivindicación 1, o de un kit según la reivindicación 2, para la elaboración de un medicamento para el
10 tratamiento del cáncer en un sujeto.
4. Uso de β -criptoxantina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino.
15
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que dicho sujeto presenta un nivel de ΔNp73 (ΔNp73) incrementado respecto a un valor de referencia.
- 20 6. Un método *in vitro* para seleccionar una terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto que comprende:
 - i) determinar el nivel de expresión de ΔNp73 (ΔNp73) en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de ΔNp73 (ΔNp73) obtenido en la
25 etapa i) con un valor de referencia,en donde si el nivel de expresión de ΔNp73 (ΔNp73) está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina.
- 30 7. Método *in vitro* según la reivindicación 6, en el que dicha terapia que comprende β -criptoxantina comprende adicionalmente la administración de oxaliplatino.

8. Un método *in vitro* para seleccionar una terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto y que está siendo tratado con oxaliplatino que comprende:
- 5
- i) determinar el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,
- 10
- en donde si el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona una terapia que comprende β -criptoxantina.
9. Un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece cáncer para una terapia que comprende β -criptoxantina, que comprende:
- 15
- i) determinar el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,
- 20
- en donde si el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona dicho sujeto para dicha terapia que comprende β -criptoxantina.
10. Método *in vitro* según la reivindicación 9, en el que el tratamiento que comprende β -criptoxantina comprende, adicionalmente, la administración de oxaliplatino.
- 25
11. Un método *in vitro* para seleccionar un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para una terapia que comprende β -criptoxantina, que comprende:
- 30
- i) determinar el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) en una muestra procedente de dicho sujeto, y
 - ii) comparar el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) obtenido en la etapa i) con un valor de referencia,
- 35
- en donde si el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) está incrementado con respecto a dicho valor de referencia, entonces se selecciona dicho sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para dicha terapia que comprende β -criptoxantina.

12. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que la muestra es una muestra de tumor o de exosomas.
- 5 13. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que la determinación del nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen, o de un fragmento de dicho ARNm, o la cuantificación del ADN complementario (ADNc) de dicho gen, o de un fragmento de dicho ADNc.
- 10 14. Método *in vitro* según la reivindicación 13, en el que el nivel de expresión de deltaNp73 (Δ Np73) se cuantifica por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o por medio de una matriz de ADN o de ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos.
- 15 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que dicho cáncer es un tipo de cáncer cuyas células muestran un nivel incrementado de Δ Np73 con respecto a un valor de referencia.
- 20 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que dicho cáncer es un tipo de cáncer seleccionado entre cáncer colorectal (CCR), cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de médula ósea, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de tiroide, leucemia, y neuroblastoma.
- 25 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, o método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que dicho cáncer es cáncer colorectal (CCR).
- 30 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 ó 15 a 17, o método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, en el que la β -criptoxantina es administrada por vía oral o parenteral.

A

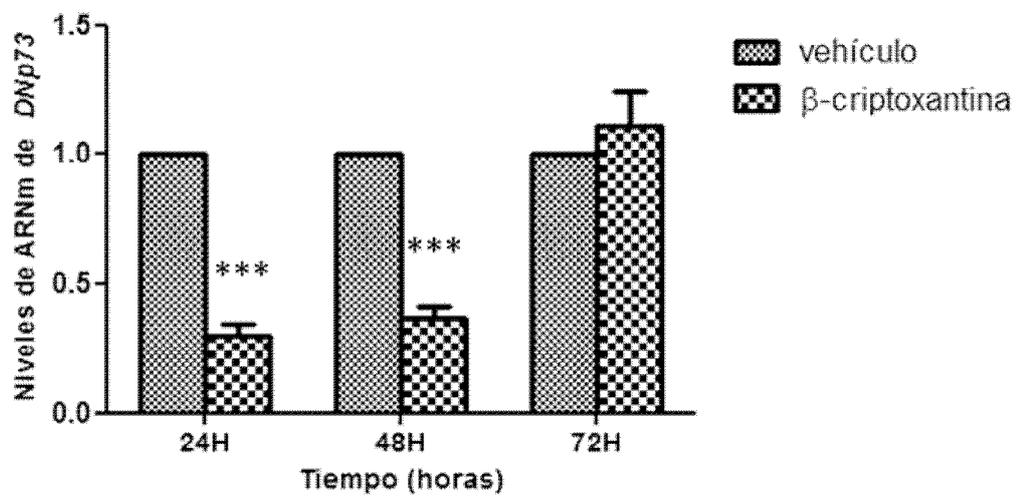
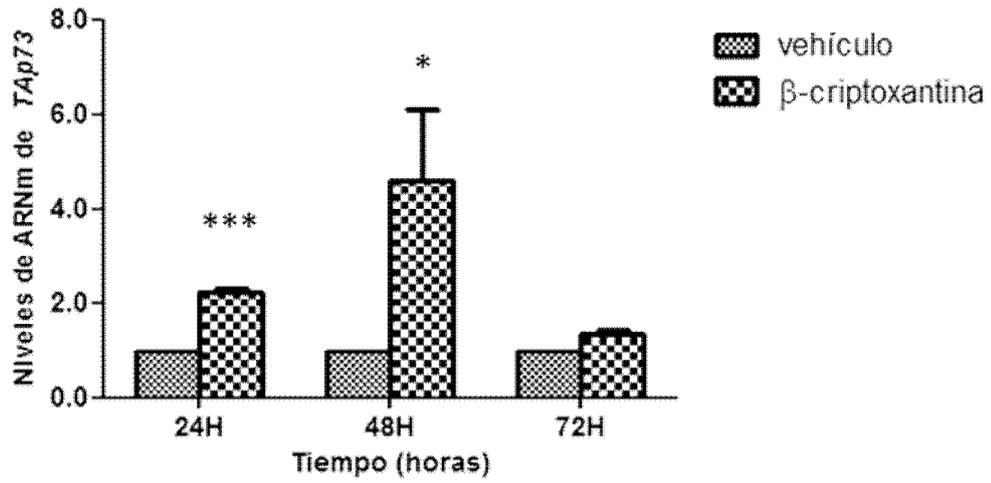


Figura 1

B

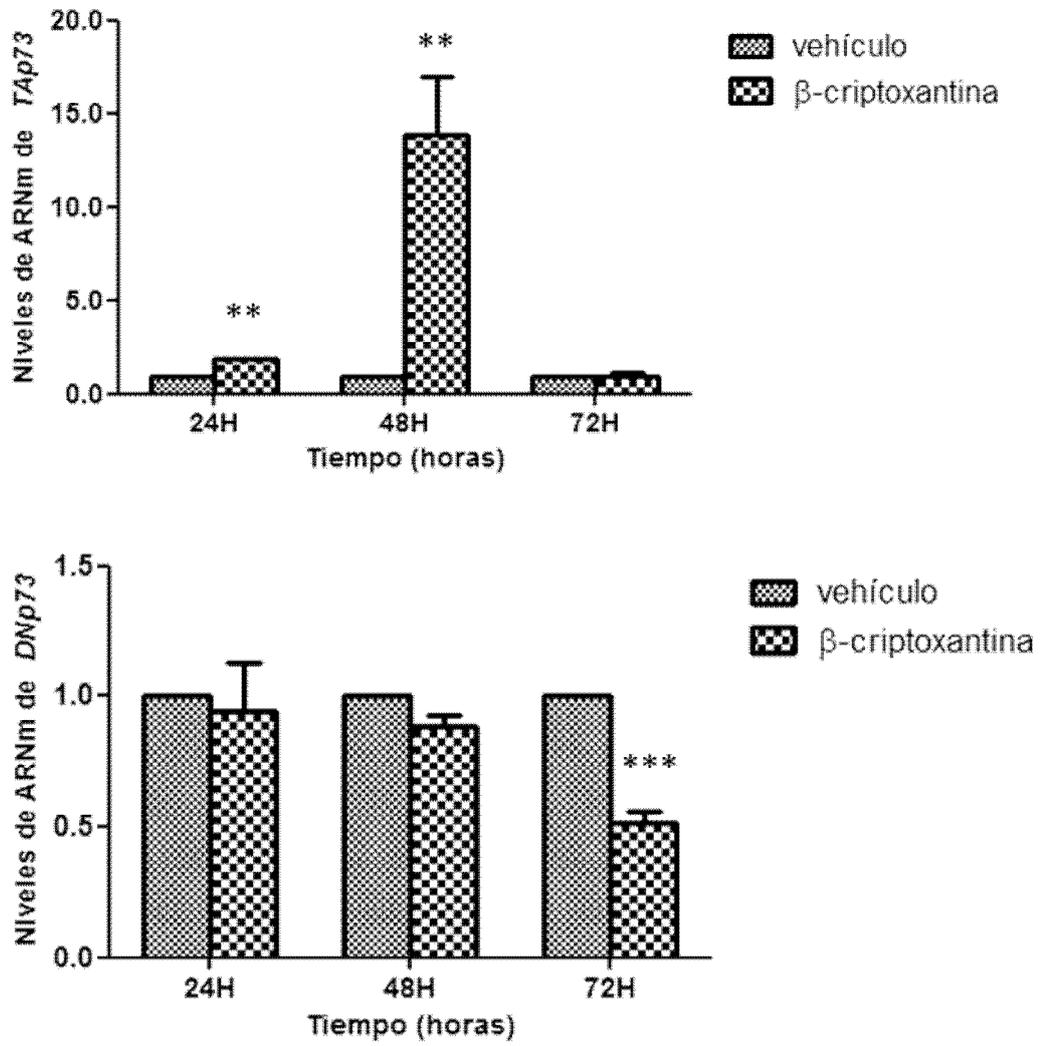


Figura 1 (continuación)

C

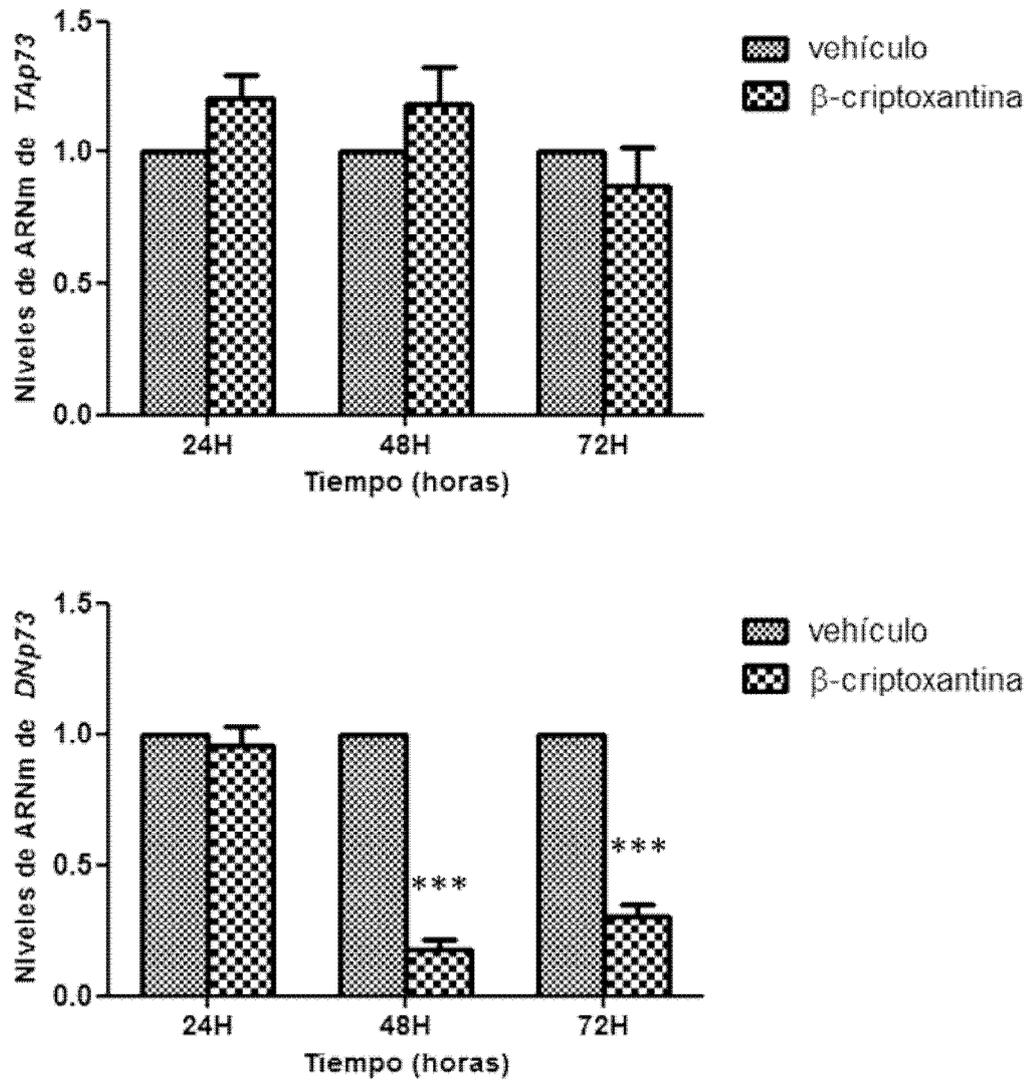


Figura 1 (continuación)

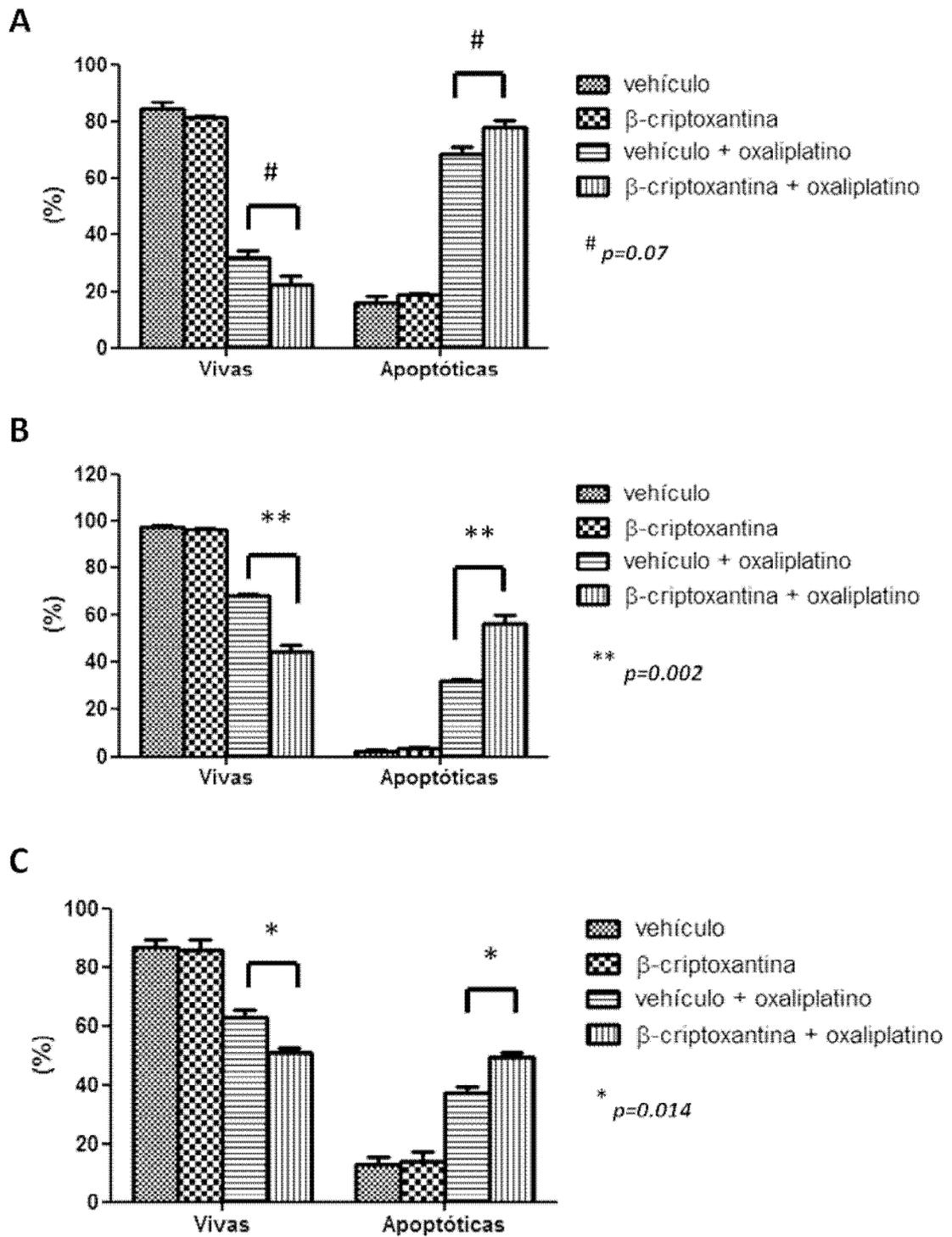


Figura 2

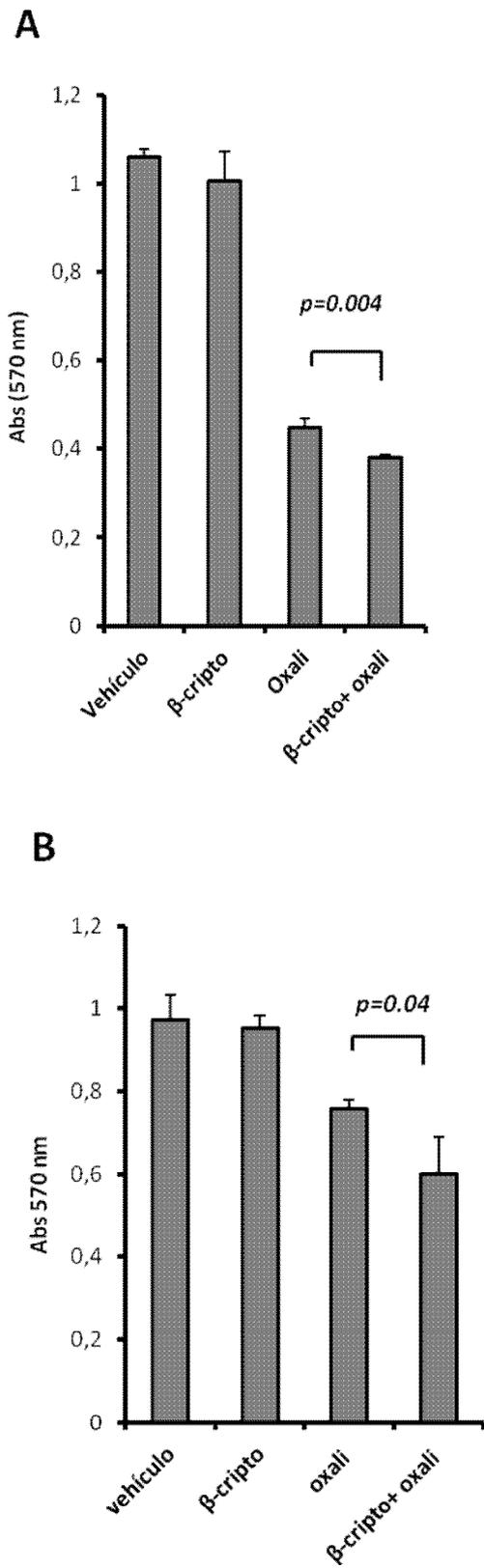


Figura 3

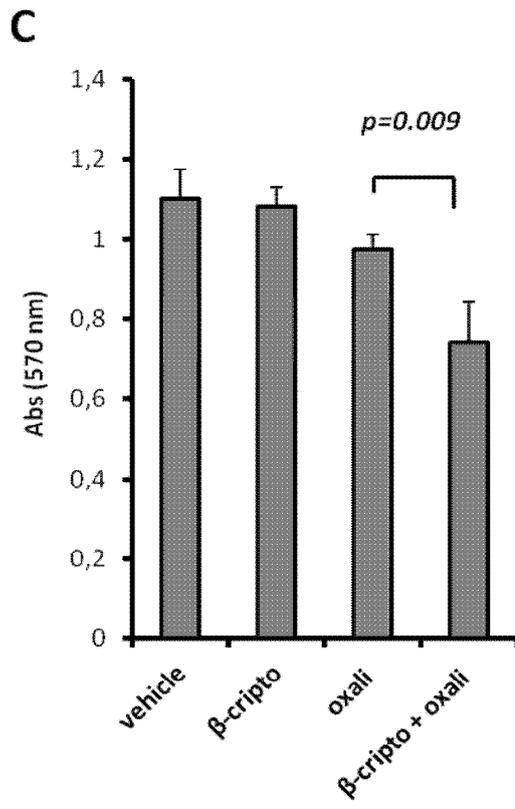


Figura 3 (continuación)

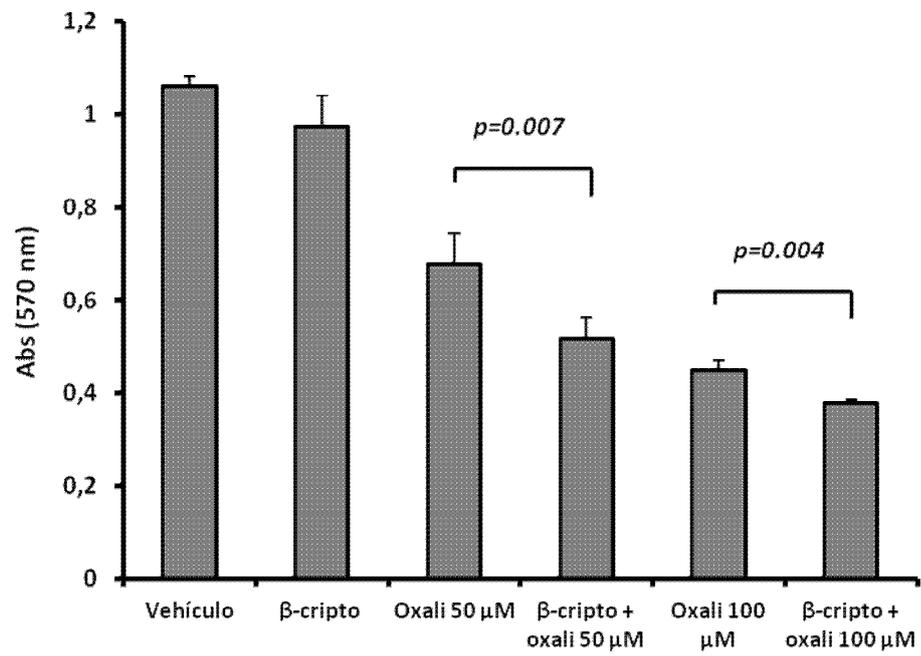


Figura 4

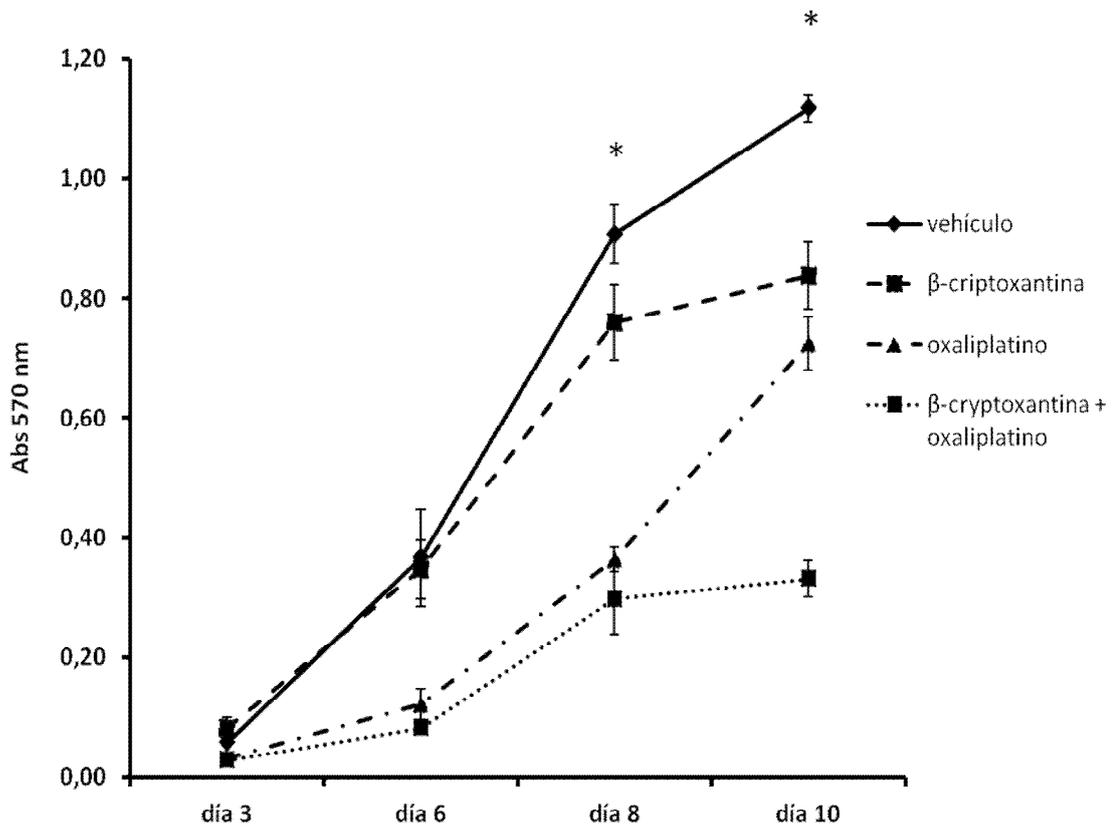


Figura 5

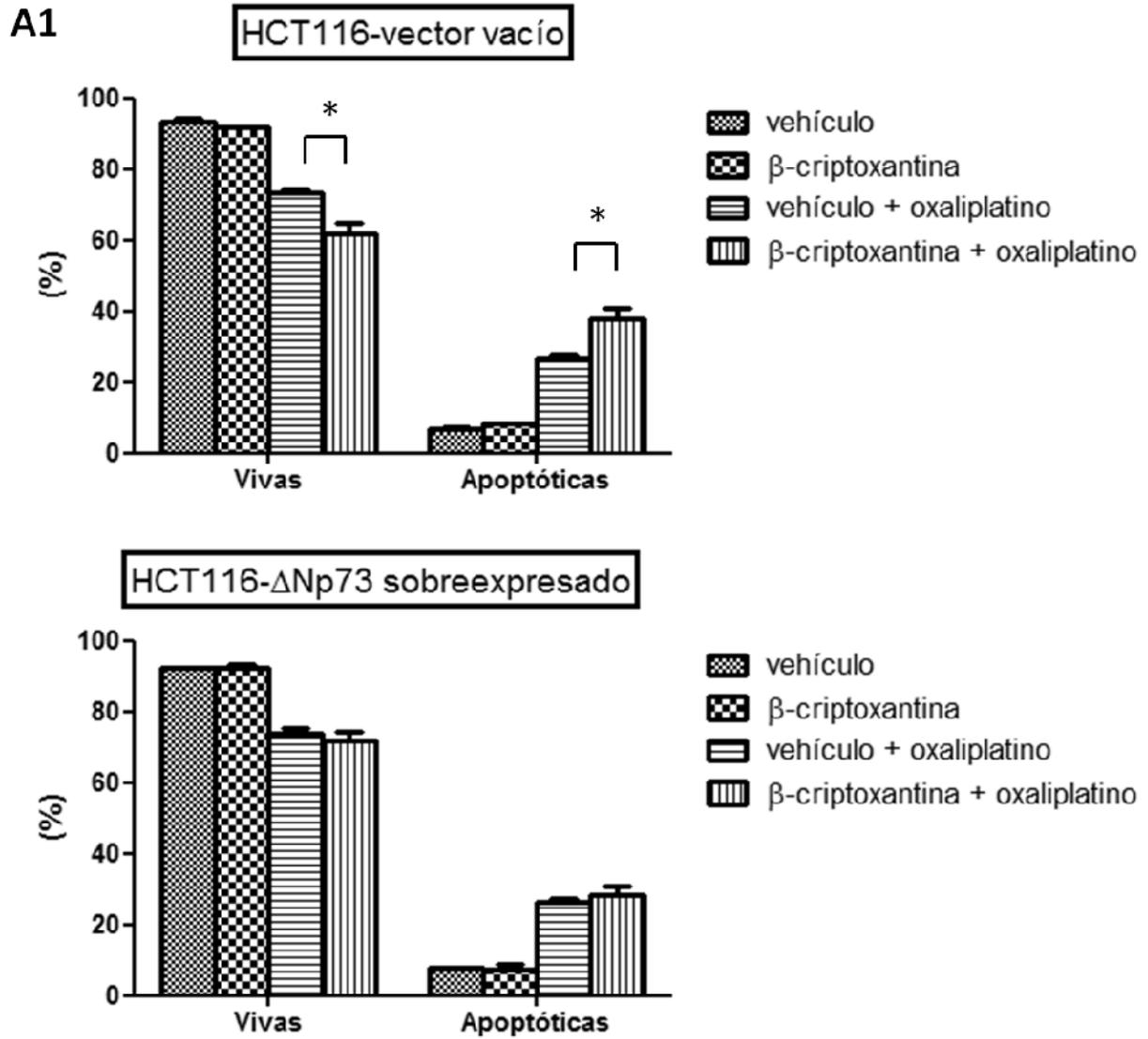


Figura 6

A2

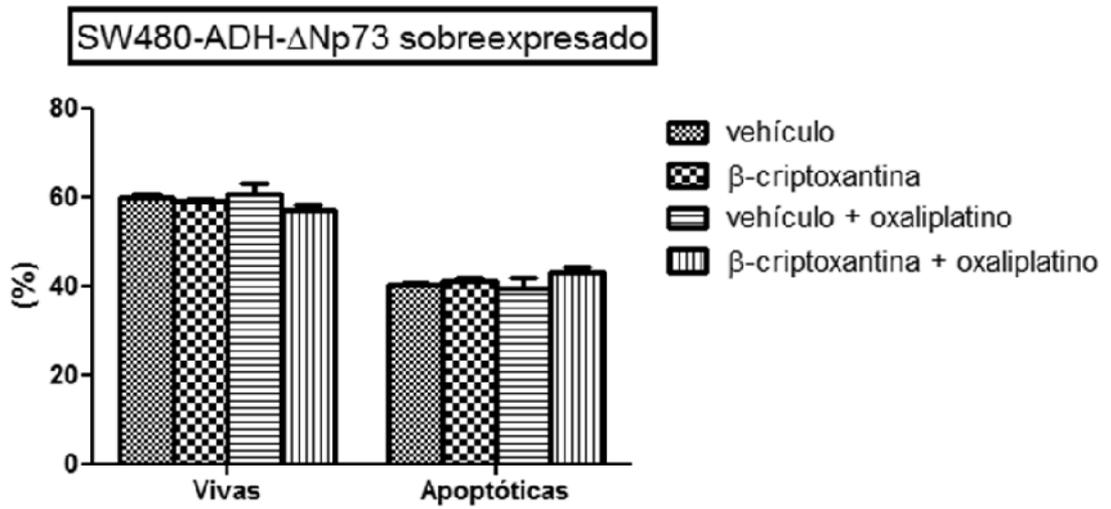
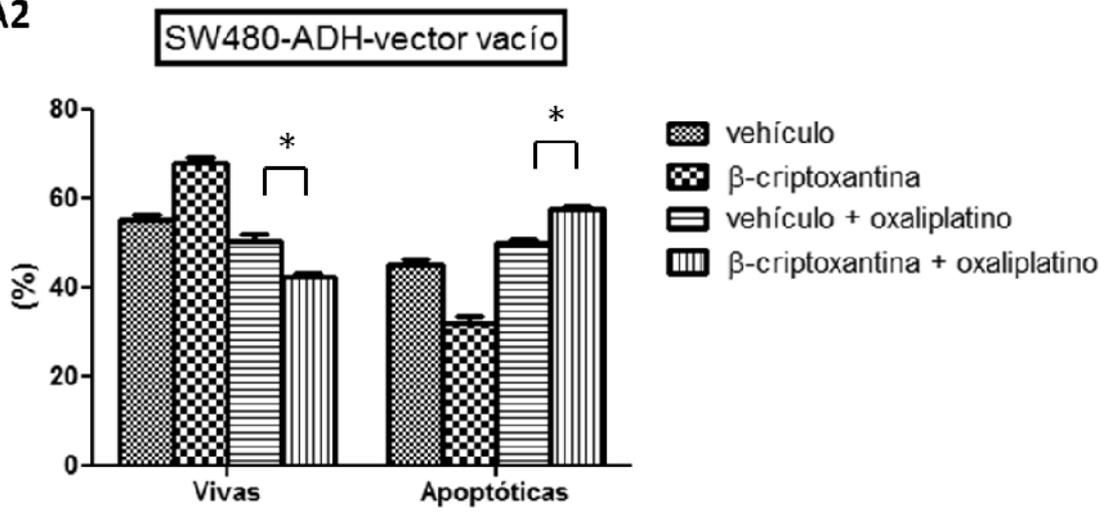


Figura 6 (continuación)

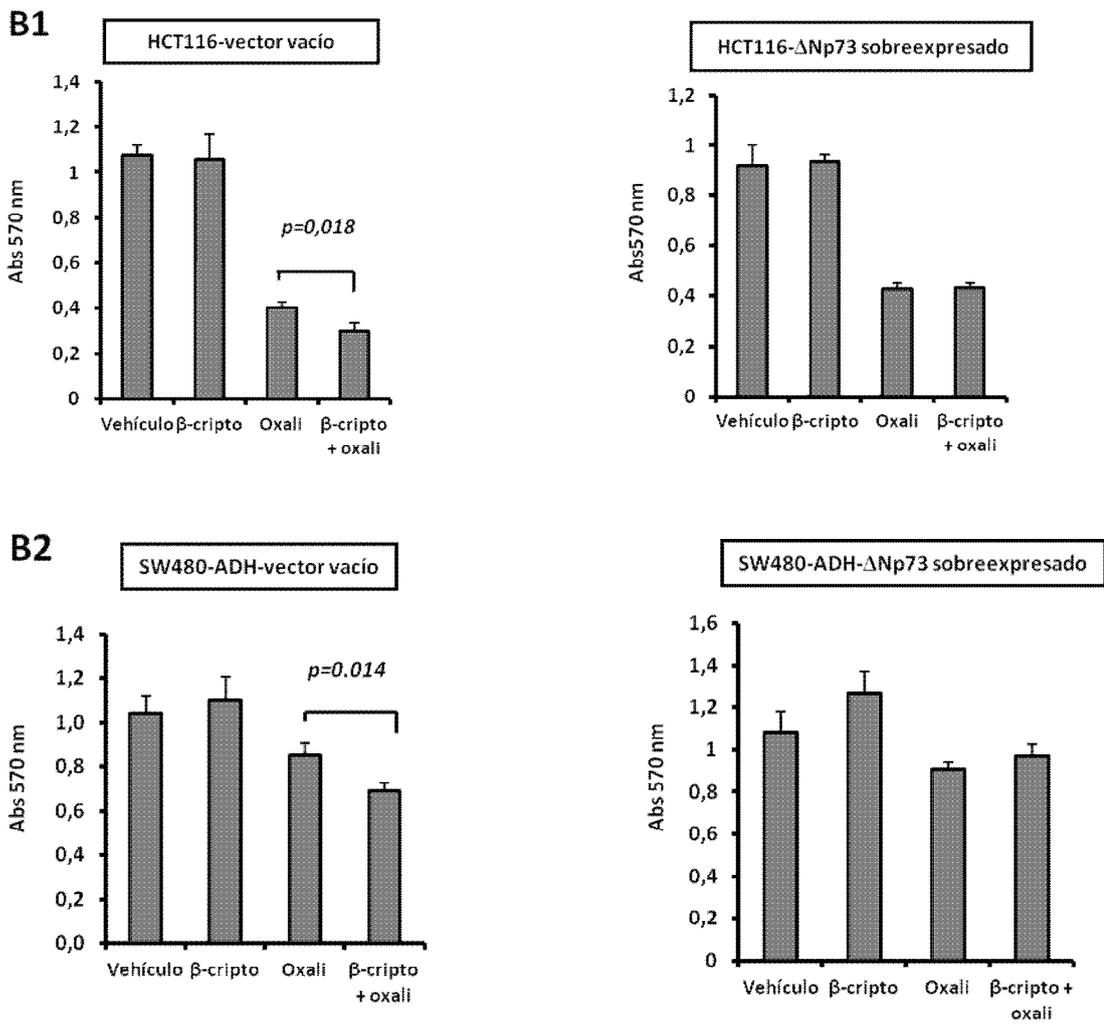


Figura 6 (continuación)

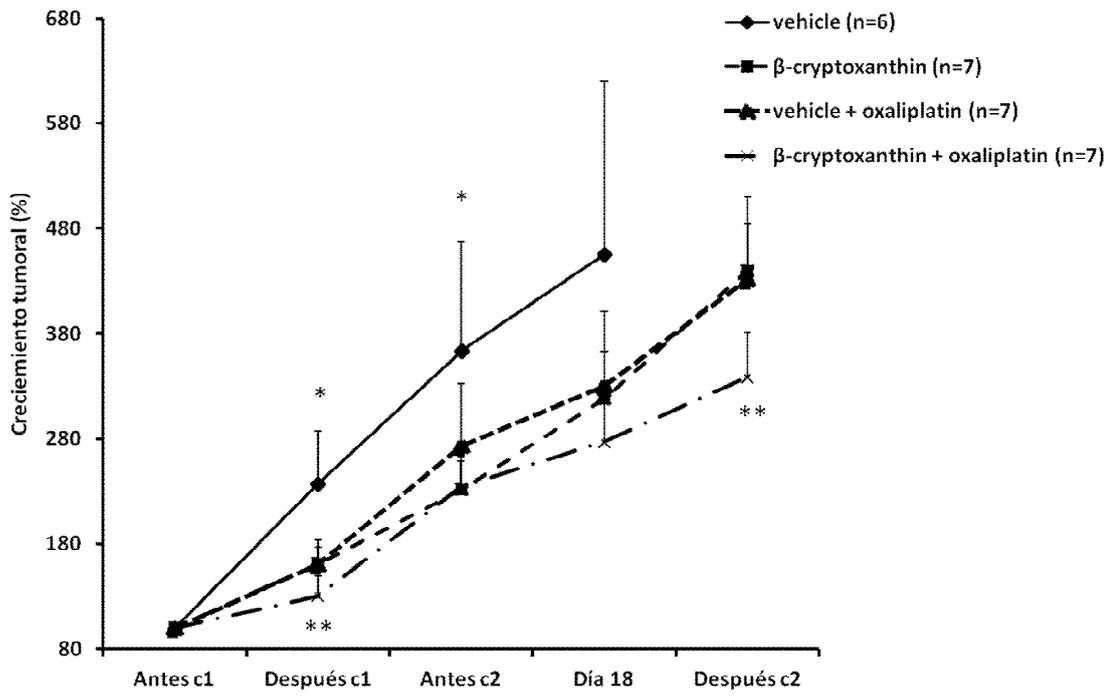


Figura 7

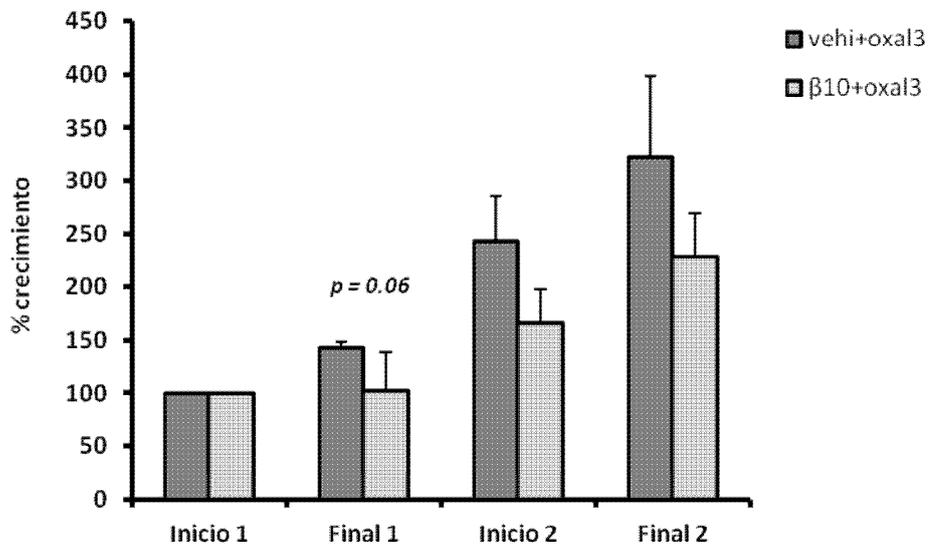


Figura 8

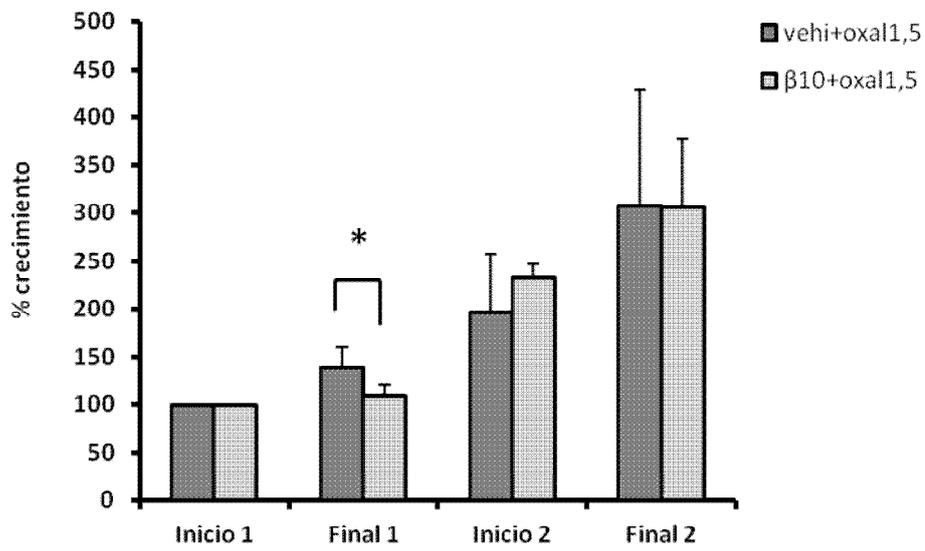


Figura 9

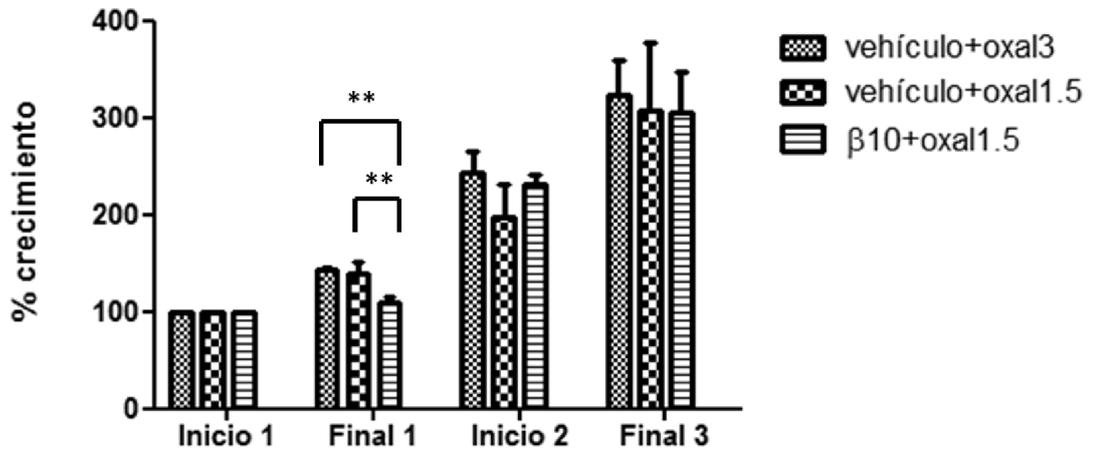


Figura 10

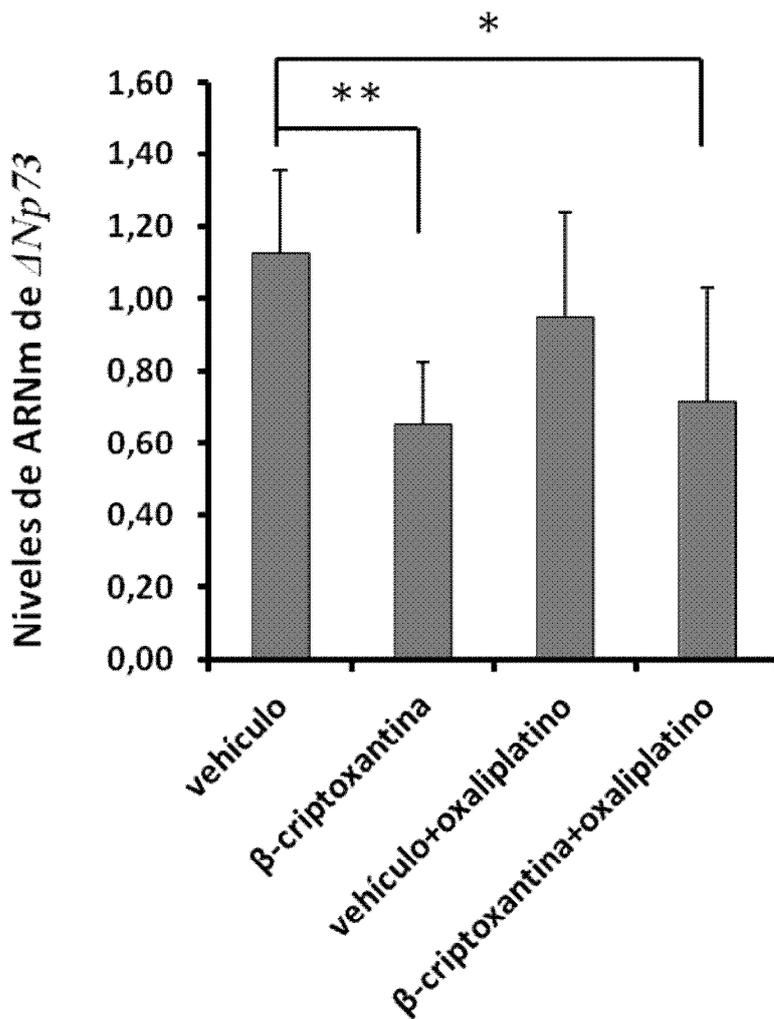


Figura 11

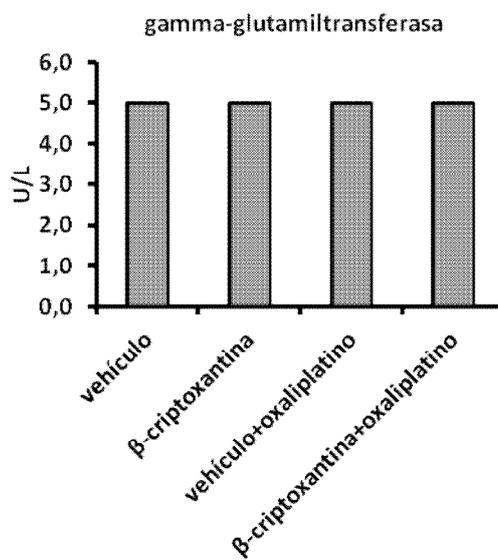
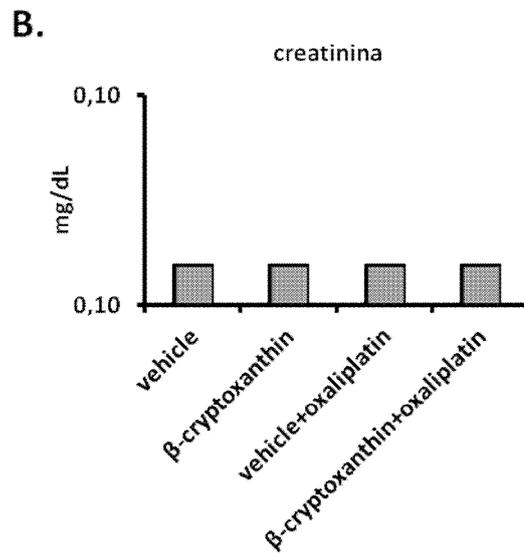
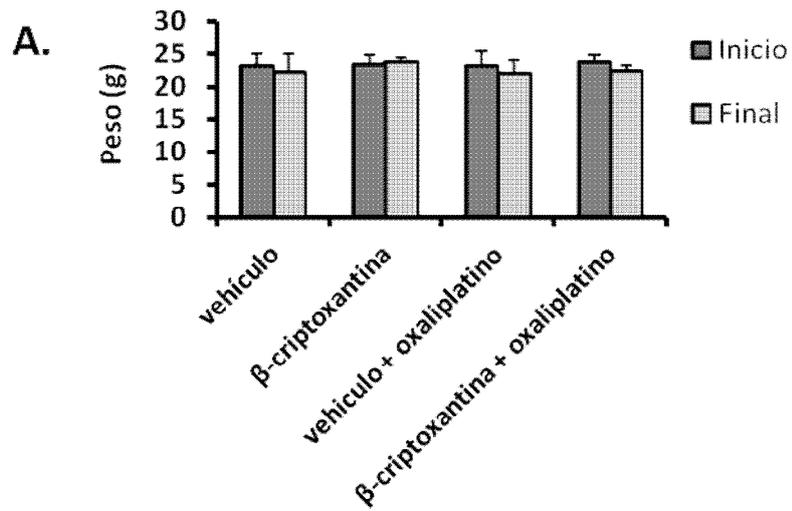


Figura 12

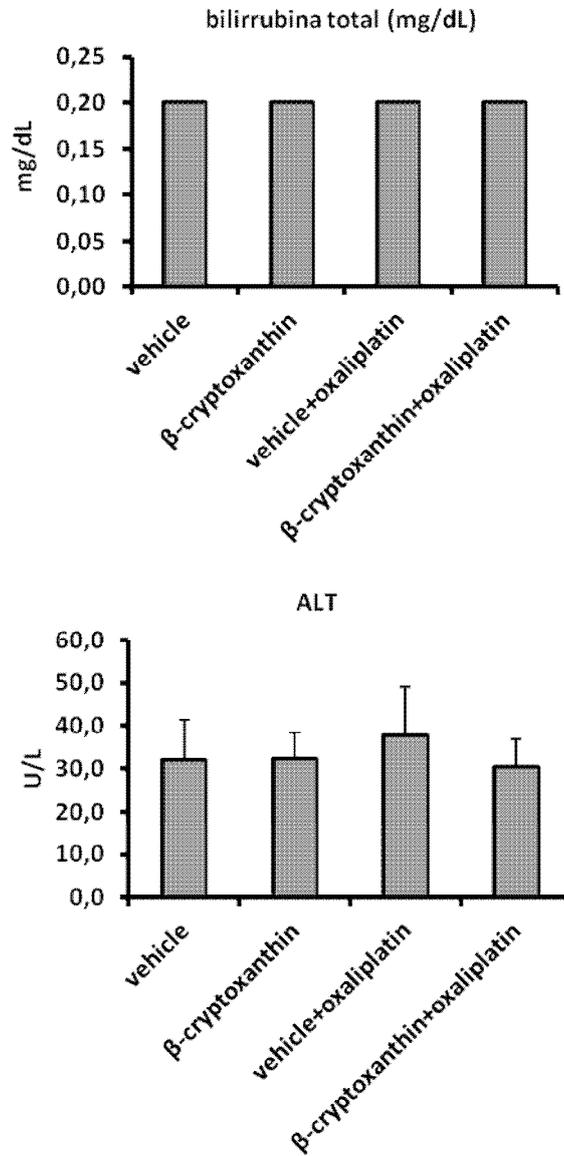


Figura 12 (continuación)

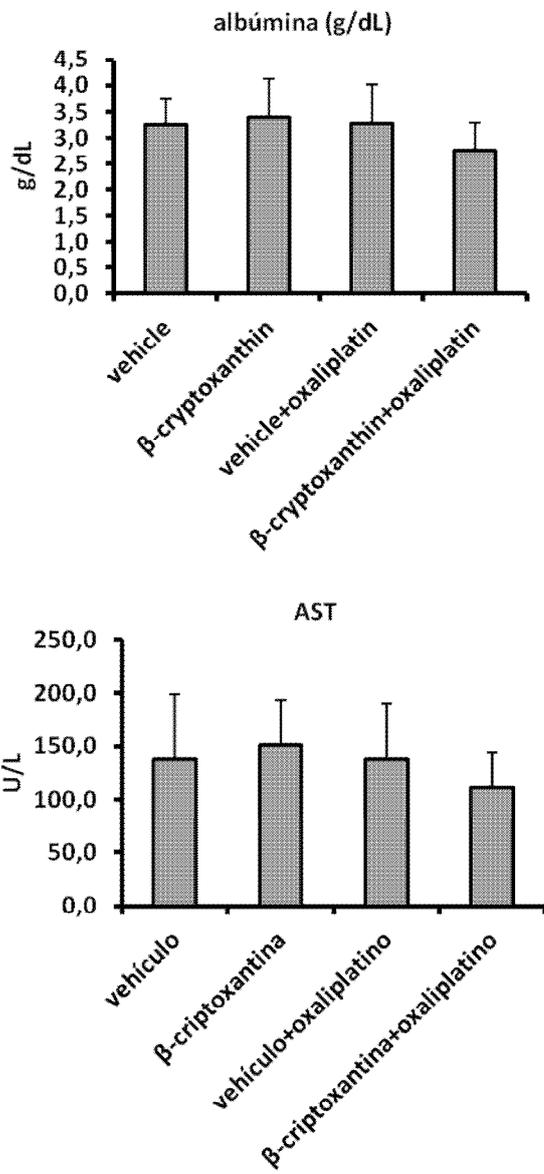


Figura 12 (continuación)



- ②① N.º solicitud: 201331376
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.09.2013
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2006115424 A1 (GRAY BRUCE N) 01.06.2006, párrafos [0003],[0006],[0015],[0020]-[0023],[0051].	1-18
A	US 2012128667 A1 (CHOW TERRY et al.) 24.05.2012, párrafos [0002],[0004],[0007],[0009],[0013],[0061]; ejemplo 5.	1-18
A	US 2013172407 A1 (KUO YUEH-HSIUNG et al.) 04.07.2013, párrafos [0014],[0031]-[0034],[0036].	1-18
A	KR 20040107902 A (JWA MI KYUNG et al.) 23.12.2004, (resumen) (en línea) (recuperado el 26.01.2015) recuperado de EPO EPODOC Database.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.01.2015

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/282 (2006.01)

A61K31/045 (2006.01)

C07C403/24 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07C

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.01.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2006115424 A1 (GRAY BRUCE N)	01.06.2006
D02	US 2012128667 A1 (CHOW TERRY et al.)	24.05.2012
D03	US 2013172407 A1 (KUO YUEH-HSIUNG et al.)	04.07.2013
D04	KR 20040107902 A (JWA MI KYUNG et al.)	23.12.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente hace referencia, tal y como ha sido presentada, a una composición que comprende beta-criptoxantina y oxaliplatino (reivindicación 1), a un kit que comprende una composición que comprende beta-criptoxantina y una composición que comprende oxaliplatino (reivindicación 2), al uso de beta-criptoxantina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto (reivindicación 3), que está siendo tratado con oxaliplatino (reivindicación 4) y que presenta un nivel de deltaNp73 incrementado respecto a un valor de referencia (reivindicaciones 5, 13 y 14). Se hace referencia, además a un método in vitro para seleccionar una terapia para el tratamiento del cáncer que padece un sujeto (reivindicaciones 6 y 7), estando dicho sujeto tratado con oxaliplatino (reivindicación 8); a un método in vitro para seleccionar un sujeto que padece cáncer para una terapia que comprende beta-criptoxantina (reivindicaciones 9 y 10) y a un método in vitro para seleccionar un sujeto que padece cáncer y que está siendo tratado con oxaliplatino para una terapia que comprende beta-criptoxantina (reivindicación 11). La muestra es una muestra de tumor o de exosomas (reivindicación 12). Se reivindica también, el uso de beta-criptoxantina para tratar un cáncer cuyas células muestra un nivel incrementado de DeltaNp73 (reivindicaciones 15 y 16) y dicho cáncer es, entre otros, cáncer colorrectal (reivindicación 17). Y por último la beta-criptoxantina es administrada por vía oral o parenteral (reivindicación 18).

NOVEDAD y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 y 8 DE LA LP

El documento D01 se refiere a un método para tratar un paciente, que comprende administrar cierta cantidad de oxaliplatino (véase párrafo [0006]) en combinación con una partícula dopada radiactivamente (véase párrafo [0015]) teniendo dicha combinación un efecto sinérgico anticáncer (véase resumen y párrafos [0020]- [0023]). Entre los cánceres tratados se encuentra el cáncer colorrectal (véase párrafo [0003]). El compuesto de oxaliplatino puede administrarse de forma oral o parenteral (véase párrafo [0051]).

El documento D02 hace referencia a una combinación sinérgica de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer (véase párrafo [0002]). El método consiste en administrar a un paciente pentamidina y oxaliplatino, entre otros, para inhibir la proliferación de células cancerígenas (véase párrafos [0004] y [0009]). El cáncer puede ser, entre otros, de colon, concretamente colorrectal (véase párrafos [0007], [0061] y ejemplo 5). La administración puede ser oral o parenteral, entre otras (véase párrafo [0013]).

El documento D03 divulga una composición farmacéutica que incluye oleoiletanolamida (OEA) que se administra para inhibir la proliferación de células cancerígenas. Dicha composición puede incluir adicionalmente ingredientes activos que producen un efecto sinérgico con OEA, como por ejemplo, los carotenoides, inhibiendo de esta forma la proliferación de células cancerígenas (véase resumen y párrafo [0014]). El tipo de cáncer que se puede tratar es, entre otros, cáncer colorrectal (véase párrafos [0031] y [0032]). Entre los carotenoides que se pueden utilizar en la composición se encuentra el compuesto beta-criptoxantina, aunque, de manera preferida, se utiliza el licopeno (véase párrafos [0033] y [0034]). La administración puede ser oral o parenteral (véase párrafo [0036]).

El documento D04 describe un método de extracción de beta-criptoxantina, en el que se indica que el compuesto de beta-criptoxantina tiene actividad antioxidante y anticancerígena.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, parece que la presente solicitud de patente, tal y como ha sido presentada, posee novedad y actividad inventiva, ya que no se ha encontrado ningún documento que haga referencia a una composición que comprenda beta-criptoxantina y oxaliplatino para el tratamiento del cáncer, concretamente, cáncer colorrectal. Se han encontrado documentos que describen el uso de oxaliplatino junto con otros compuestos para el tratamiento de dicho cáncer (véase documentos D01, y D02) y documentos que indican la actividad anticancerígena del compuesto de beta-criptoxantina (véase documento D04), pero no en combinación con oxaliplatino para el tratamiento de cáncer. Tampoco, en dichos documentos, existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-18, por lo que las reivindicaciones 1-18 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.