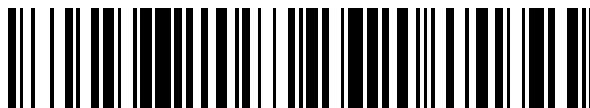


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 452**

21 Número de solicitud: 201331207

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.08.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.05.2015

71 Solicitantes:

DALANA3 S.L. (100.0%)
Avda. Juan Carlos I, 3, B-17
35019 Las Palmas de Gran Canaria ES

72 Inventor/es:

GARCÍA CASTELLANO, José Manuel

74 Agente/Representante:

ZEА CHECA, Bernabé

54 Título: **Potenciación del efecto del metotrexato mediante el uso combinado con estatinas lipofílicas**

57 Resumen:

Potenciación del efecto del metotrexato mediante el uso combinado con estatinas lipofílicas.

La invención proporciona el uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa y la estatina lipofílica junto con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

ES 2 535 452 A1

DESCRIPCIÓN

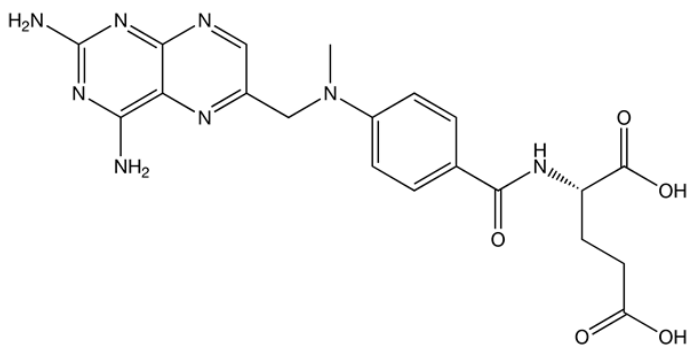
Potenciación del efecto del metotrexato mediante el uso combinado con estatinas lipofílicas

5 La presente invención se enmarca en el campo de la medicina clínica, particularmente en el campo de la oncología y las enfermedades autoinmunes como la psoriasis y la artritis reumatoide. En concreto la invención proporciona una terapia mejorada para dichas enfermedades mediante la combinación del metotrexato con estatinas lipofílicas.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

El metotrexato ((2S)-2-[(4-[[[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil](metil)amino]benzoil)amino]pentanodioico, número CAS 59-05-2, fórmula I, abreviado como MTX) es un antimetabolito que posee actividad antiproliferativa y antiinflamatoria al inhibir competitivamente a la

15 enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima que regula la cantidad de folato intracelular disponible para la síntesis de ácidos nucleicos en fase S del ciclo celular e impide la conversión de homocisteína a metionina durante la síntesis de proteínas.



20 Fórmula I

El MTX es usado como quimioterápico de primera línea para el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas, como el osteosarcoma. Se administra en diversas neoplasias en dosis muy elevadas (3 a 12 g/m² de superficie de paciente), en pacientes con función renal normal y se administra con hiperhidratación (3 l/m² de superficie de paciente) y

25 alcalinización. También se usa para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias entre las que destaca la artritis psoriásica y la artritis reumatoide.

Sin embargo, es un fármaco que produce en ocasiones importantes y severos efectos

secundarios adversos que condicionan una elevada morbi-mortalidad en los pacientes que hacen uso del fármaco. En algunos casos incluso obliga a la interrupción prematura de la quimioterapia en un tercio de los pacientes a pesar de haber realizado un adecuado rescate con ácido fólico.

5

Se ha descrito mielosupresión, mucositis y neurotoxicidad con encefalopatía aguda o crónica en los pacientes tratados con MTX. La encefalopatía aguda generalmente se desarrolla en el 3%-15% de los pacientes dentro de los primeros 5 a 14 días después del inicio del tratamiento, y pueden incluir cefalea, náuseas, vómitos, letargia, alteración del estado mental, visión borrosa, afasia, hemiparesia y convulsiones. En estos casos, la mayoría de los pacientes pueden reanudar el tratamiento con el MTX sin secuelas neurológicas permanentes, aunque en el 10%-56% pueden experimentar recidiva con la reexposición. A ello se le puede añadir una encefalopatía crónica que se desarrolla lentamente, pudiendo progresar, y pudiendo dañar la función neurológica de forma permanente.

10

15

La administración de MTX en dosis altas es de vital importancia en los niños afectados de osteosarcomas. En estos casos, el retraso en la eliminación de MTX y la exposición prolongada a este fármaco puede llevar a una toxicidad importante, sobre todo a un fallo renal agudo por una obstrucción renal secundaria al depósito de cristales de MTX y sus metabolitos (17-hidroxi-metotrexato) en los túbulos renales, o bien por toxicidad directa del fármaco sobre estos túbulos.

20

Ante este problema existe la necesidad de encontrar terapias capaces de disminuir los efectos secundarios nocivos del tratamiento con MTX a la vez que se mantiene o mejora su actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y antitumoral.

25

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

El inventor ha encontrado que el uso combinado de una estatina lipofílica y un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), como por ejemplo el metotrexato (MTX), proporciona un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes para las cuales está indicado el tratamiento con estos fármacos inhibidores de la DHFR. Tal y como se muestra en los ejemplos que siguen a continuación, el uso de una estatina lipofílica en terapia de combinación con MTX potencia el efecto antitumoral del

30

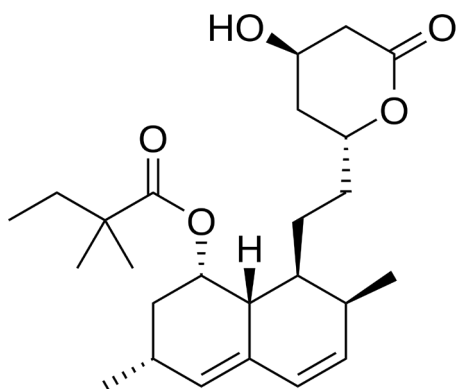
35

MTX, permitiendo disminuir la dosis de MTX sin afectar a la efectividad del tratamiento. Esta terapia combinada proporciona enormes beneficios en pacientes que sufren una enfermedad para cuyo tratamiento está indicada la administración de un inhibidor de la DHFR, como por ejemplo pacientes de cáncer y de algunas enfermedades autoinmunes, ya que, como consecuencia de estar expuestos a menores dosis de inhibidor de la DHFR, dichos pacientes sufren menos efectos secundarios sin perjuicio de la efectividad de su tratamiento.

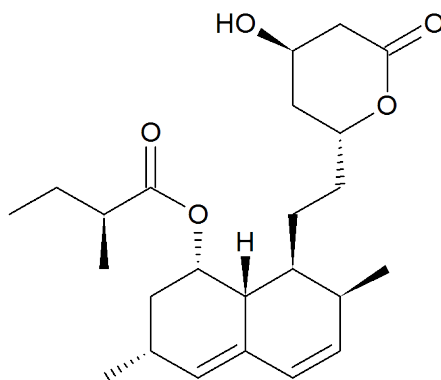
Así pues, un primer aspecto de la invención proporciona un inhibidor de la enzima DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este aspecto se puede reformular como el uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y el inhibidor de la enzima DHFR. La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, en un paciente que lo necesite, donde dicho método de tratamiento comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las estatinas lipofílicas son aquellas que son poco solubles en agua. En una realización particular de la invención la estatina lipofílica que se utiliza en terapia combinada con el MTX

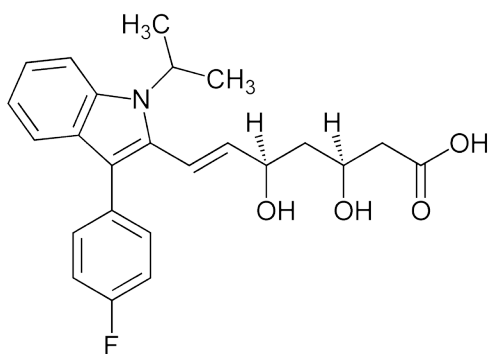
es simvastatina (número CAS: 79902-63-9, fórmula II) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otra realización particular, la estatina lipofílica es atorvastatina (número CAS: 134523-00-5, fórmula V) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otra realización particular, la estatina lipofílica es fluvastatina (número CAS: 93957-54-1, fórmula IV) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En otra realización particular, la estatina lipofílica es lovastatina (número CAS: 75330-75-5, fórmula III).



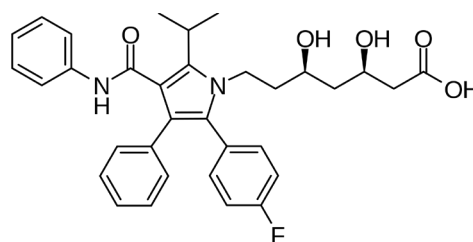
10 Fórmula II



Fórmula III



Fórmula IV

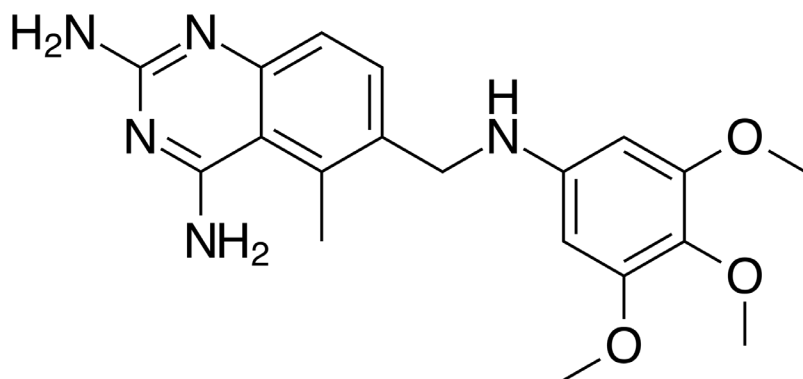


Fórmula V

15 Además, la invención contempla utilizar para la terapia de combinación con estatinas lipofílicas cualquier análogo o derivado del MTX que puedan utilizarse como alternativa terapéutica al MTX y actúen según un mecanismo de acción igual o muy similar al del MTX. Entre estos destacan otros fármacos inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa, tales como trimetrexato (5-metil-6-[(3,4,5-trimetoxyfenil) aminometil] quinazolina-2,4-diamina, compuesto de fórmula VI) y el pemetrexel (ácido 5-metil-6-[(3,4,5-trimetoxifenil) aminometil] quinazolina-2,4-diamina, compuesto de fórmula VII). Como será evidente para el experto en la materia, estos equivalentes, análogos y derivados del MTX son susceptibles de

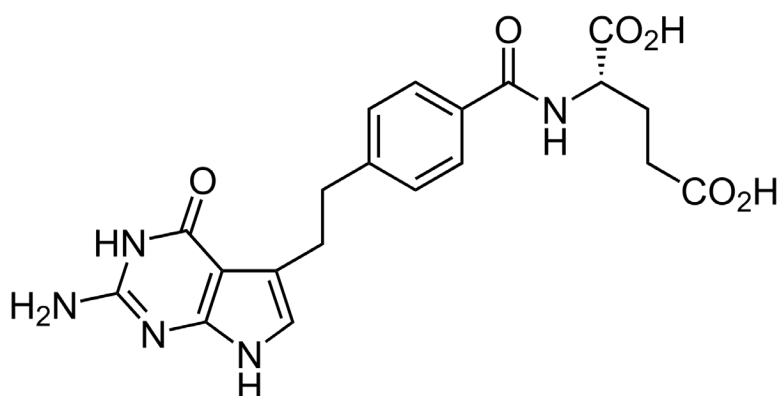
20

interactuar con las estatinas lipofílicas y ver su efecto potenciado por ellas, al igual que el MTX, y por lo tanto muestran las mismas ventajas al ser empleados en terapia combinada con éstas.



5

Fórmula VI



Fórmula VII

10

Cualquier sal farmacéuticamente aceptable de un inhibidor de la DHFR o de una estatina lipofílica puede ser utilizada para los fines de la invención. El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales preparadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas. No existen limitaciones en relación a las sales, salvo que cuando se usan para fines terapéuticos deben ser aceptables farmacéuticamente.

15

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos para la terapia combinada de la invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar a partir del compuesto madre, el cual contiene una porción ácida o básica, mediante métodos convencionales en la práctica química. Generalmente dichas sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar el ácido o base libre de dichos

20

compuestos con una cantidad estequiométricamente adecuada del ácido o sal farmacéuticamente aceptable en presencia de agua, de un disolvente orgánico o de una mezcla de ambos. Cuando las sales se preparan a partir de compuestos madre básicos, dichas sales se preparan a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, 5 incluyendo ácidos orgánicos e inorgánicos. Dichos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido acético, benzosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, láctico, maléico, málico, mandélico, metanosulfónico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares.

10 La invención contempla que los compuestos para su uso en la terapia combinada pueden estar en forma cristalina, bien como compuestos de solvatación libre o como solvatos (por ejemplo hidratos). Los métodos para solvatación son conocidos en el estado de la técnica.

La presente invención también contempla el uso de un profármaco de un inhibidor de la DHFR o de una estatina lipofílica. Por "profármaco" se entiende una sustancia que se 15 administra en una forma inactiva (o menos activa) pero que tras su administración se transforma en su correspondiente fármaco activo como consecuencia de los procesos metabólicos habituales en el paciente. En particular, el término profármaco se refiere a ésteres aceptable e hidrolizables fisiológicamente.

20 Por el término "éster aceptable e hidrolizable fisiológicamente" se entiende un éster en que el grupo hidroxilo está esterificado y el cual es hidrolizable bajo condiciones fisiológicas para dar un ácido el cual es por sí mismo tolerable fisiológicamente a las dosis a las que se administra. Ejemplos de tales ésteres incluyen acetatos y benzoatos del MTX o de las 25 estatinas lipofílicas.

La invención también contempla la administración del inhibidor de DHFR en formato conjugado con sustancias como liposomas, glicerol, albúmina, diglicéridos, aminoácidos como fenilalanina o prolina, o péptidos como Arginina-Glicina-Asparagina o un péptido 30 "hairpin". La conjugación del fármaco con estas sustancias puede incrementar su biodisponibilidad.

En una realización particular, el inhibidor de DHFR en la terapia combinada de la invención es MTX. En otra realización, la terapia combinada de la invención se lleva a cabo con MTX y 35 simvastatina.

La terapia de combinación de la presente invención proporciona una ventaja adicional que consiste en la posibilidad de utilizar la terapia combinada no sólo con fines terapéuticos, sino también con fines preventivos, concretamente, con el fin de evitar recidivas (o recaídas) en los pacientes que han respondido satisfactoriamente a un tratamiento previo para el cáncer o enfermedad autoinmune.

Así, otro aspecto de la invención proporciona un inhibidor de DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y el inhibidor de DHFR. Este aspecto se puede reformular como el uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa. La presente invención también proporciona un método para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis en un paciente que lo necesite, donde dicho método de tratamiento comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los efectos secundarios del uso de la administración de los inhibidores de DHFR como el MTX según la práctica clínica vigente son considerables, de modo que no se ha contemplado su uso en pacientes en los que la patología ha remitido o desaparecido gracias a un tratamiento anterior. Al poder emplear menores concentraciones de, por ejemplo, MTX

con mayor efectividad terapéutica, la terapia combinada de la invención puede usarse para evitar una recaída del paciente que ha respondido a una terapia previa para el tratamiento de una enfermedad que se beneficia de la administración del MTX, como por ejemplo, un cáncer. En este sentido es importante señalar que el inventor ha encontrado que la
5 potenciación del efecto del inhibidor de DHFR por la estatina lipofílica es particularmente relevante a dosis bajas, particularmente a dosis de MTX comprendidas de 1 a 3 mg/m² de superficie corporal del paciente.

En cuanto a las enfermedades susceptibles de beneficiarse de la terapia combinada de la
10 presente invención se encuentran aquellas enfermedades para las cuales está indicada la administración de los inhibidores de DHFR, tales como el MTX, en particular el cáncer y algunas enfermedades autoinmunes. En una realización particular la terapia combinada de la invención puede utilizarse para el tratamiento de un cáncer seleccionado del grupo que
15 consiste en osteosarcoma, coriadenoma destruens, coriocarcinoma, mola hidatidiforme, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, linfoma de células grandes, linfoma de alto grado, linfoma de alto grado, linfoma no Hodking, linfosarcoma, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneo, mesotelioma pleural, cáncer de mama, cáncer de ovario, tumor epidermoide de cabeza, tumor epidermoide de cuello, carcinoma pulmonar de células
20 pequeñas y cáncer de la vejiga urinaria. En una realización particular, la terapia combinada de la invención es para el tratamiento de osteosarcoma. En otra realización particular el cáncer es leucemia linfocítica aguda.

Otro grupo de enfermedades que se pueden beneficiar de la terapia combinada de inhibidor de DHFR y estatinas lipofílicas está constituido por algunas enfermedades autoinmunes,
25 particularmente psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis.

Como será evidente para el experto en la materia, la terapia combinada de la presente invención es eficaz no sólo cuando los principios activos, el inhibidor de DHFR y la estatina lipofílica, se utilizan en una sola composición, sino también cuando se utilizan en dos
30 composiciones diferentes, ya sean administradas de forma simultánea o por separado en cualquier orden y con un intervalo terapéuticamente efectivo. Además, el experto en la materia entenderá que el inhibidor de DHFR puede ser prescrito por el médico especialista para ser utilizado junto con una estatina lipofílica en una terapia de combinación con el fin de
35 tratar o prevenir la recidiva de una enfermedad que se beneficie de la administración del

inhibidor de DHFR, y viceversa.

Así, un aspecto de la invención se refiere a un inhibidor de la enzima DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis cuando se usa en terapia de combinación con una estatina lipofílica. Este aspecto se puede reformular como el uso de un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho medicamento es para uso en terapia combinada con una estatina lipofílica. La invención también se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis en un paciente que lo necesite, donde dicho método comprende administrar a un sujeto un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en terapia de combinación con una estatina lipofílica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención de recidivas de cáncer cuando se usa en terapia de combinación con una estatina lipofílica. Este aspecto se puede reformular como el uso de MTX, un profármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho medicamento es para uso en terapia combinada con una estatina lipofílica. La invención también se refiere a un método para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis,

dermatomiositis y sarcoidosis en un paciente que lo necesite, donde dicho método comprende administrar a un sujeto un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en terapia de combinación con una estatina lipofílica.

5

Además la presente invención proporciona un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y de una estatina lipofílica para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis,

10

dermatomiositis y sarcoidosis. Este aspecto se puede reformular como el uso de un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y de una estatina lipofílica para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad

15

seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis. La invención también proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis,

20

dermatomiositis y sarcoidosis en un paciente que lo necesite, donde dicho método comprende administrar a un sujeto un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una estatina lipofílica.

25

En otro aspecto la invención proporciona un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y de una estatina lipofílica para su uso en la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis,

30

dermatomiositis y sarcoidosis. Este aspecto se puede reformular como el uso de un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y de una estatina lipofílica para la preparación de un medicamento para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis

35

juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y

sarcoidosis. La invención también proporciona un método para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis en un paciente que lo necesite, donde dicho método
5 comprende administrar a un sujeto un inhibidor de la DHFR seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una estatina lipofílica.

La presente invención contempla que en la terapia combinada el inhibidor de DHFR y la
10 estatina lipofílica se administren simultáneamente. La invención también contempla que el inhibidor de DHFR y la estatina lipofílica se administren de forma separada, en cualquier orden y con un intervalo terapéuticamente efectivo. El intervalo terapéuticamente efectivo dependerá en gran medida de la enfermedad considerada y de si el fin es el tratamiento o la prevención de recaídas, pero siempre tendrá en cuenta que gracias a la combinación con la
15 estatina lipofílica la cantidad de inhibidor de DHFR administrada al paciente es mucho menor que en el tratamiento convencional.

Cuando el inhibidor de DHFR que se utiliza en la terapia de combinación de la invención es MTX, la dosis a administrar de este fármaco puede estar comprendida de 0,5 mg/m² de
20 superficie del paciente a 20 g/ m² de superficie del paciente y la dosis de estatina lipofílica puede estar comprendida de 10 a 100 mg. La dosis aproximada dependerá de la enfermedad del paciente y de si el objetivo de la terapia es el tratamiento de la enfermedad o la prevención de recidivas. Así, para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda se puede administrar una dosis de MTX comprendida de 1 a 3 mg/m² de superficie del paciente. Para
25 el tratamiento de osteosarcoma, se puede administrar una dosis de MTX comprendida de 12 a 15 g/m² de superficie del paciente. En ambos casos, se puede administrar una dosis de choque inicial de estatina lipofílica comprendida de 40 a 80 mg y una dosis de mantenimiento comprendida de 10 a 30 mg, por ejemplo 20 mg. Para la prevención de recidivas de osteosarcoma se puede administrar una dosis que contiene 3-20 mg/m² de
30 superficie de paciente de MTX y 20 mg de estatina lipofílica. Del mismo modo, el régimen de administración dependerá de la enfermedad en cuestión y de si el objetivo es el tratamiento o la prevención de recaídas para esta enfermedad. En general, en la terapia de combinación de la presente invención el MTX se puede administrar con una frecuencia comprendida de 1 a 5 semanas y la estatina lipofílica se puede administrar con una frecuencia comprendida de
35 1 a 7 días. Por ejemplo, cuando el objetivo de la terapia combinada es el tratamiento de

leucemia linfocítica aguda, se puede administrar una dosis de MTX comprendida de 1 a 3 mg/m² de superficie del paciente diaria durante 4-6 semanas. Por ejemplo, cuando el objetivo de la terapia combinada es el tratamiento de osteosarcoma, se puede administrar una dosis de MTX comprendida de 12 a 15 g/m² de superficie del paciente cada 14 días. En
5 ambos casos, se puede administrar una dosis de choque inicial de estatina lipofílica comprendida de 40 a 80 mg y una dosis de mantenimiento comprendida de 10 a 30 mg, por ejemplo 20 mg. Por ejemplo cuando el objetivo de la terapia de la invención es para la prevención de recidivas de la osteosarcoma, se puede administrar una dosis que contiene 3-20 mg/m² de superficie de paciente de MTX y 20 (mg) de estatina lipofílica cada semana.

10

Como se ha comentado anteriormente, el MTX y la estatina lipofílica en el sentido de la terapia combinada de la invención pueden administrarse de manera simultánea, secuencial o separada. En el caso de que la administración sea simultánea, los fármacos pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o bien cada fármaco puede formar parte
15 de una composición farmacéutica diferente.

15

Un aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
20 y una estatina lipofílica junto con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Esta composición es útil para su uso en la terapia combinada de la invención para el tratamiento o prevención de recidivas de las enfermedades arriba mencionadas.

20

La expresión "excipientes y/o vehículos farmacéuticamente" se refiere a materiales,
25 composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica. También debe ser apto para su uso en contacto con tejidos u órganos de seres humanos y animales sin producir excesiva toxicidad, irritación, reacciones alérgicas, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones en consonancia con una
30 razonable relación beneficio/riesgo.

30

En una realización particular, la estatina lipofílica en la composición de la invención se selecciona del grupo que consiste en atorvastatina, simvastatina, fluvastatina y lovastatina, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. En otra realización particular, el
35 inhibidor de DHFR es MTX. En otra realización, la composición comprende MTX y

35

simvastatina.

La composición de la invención puede estar formulada en una unidad de dosificación para administración por vía oral. En una realización particular, la unidad de dosificación para administración oral es un comprimido, píldora, pastilla, tableta, cápsula, solución, suspensión, gel o gelatina. En otra realización, la composición de la invención está formulada en una unidad de dosificación para administración por vía intravenosa, intramuscular, transdérmica, rectal, intracavitaria o inhalada.

En una realización particular, el régimen de administración de la composición de la invención para el tratamiento de las enfermedades arriba mencionadas dependerá del contenido en inhibidor de DHFR y estatina lipofílica en la unidad de dosificación, así como de su indicación. Para establecer el régimen de administración de la composición de la invención se pueden tener en cuenta las recomendaciones de dosis descritas más arriba para el tratamiento combinado.

En el caso de que la administración de inhibidor de DHFR y estatina lipofílica según la terapia combinada de la invención sea secuencial o separada, cada fármaco estará formulado en una composición diferente, pudiendo suministrarse todo ello en un kit junto con instrucciones adecuadas para su administración en el tratamiento o en la prevención de recidivas de las enfermedades arriba indicadas.

Así, otro aspecto de la invención proporciona un kit que comprende una primera composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una segunda composición farmacéutica que comprende una estatina lipofílica; e instrucciones para el uso de ambas composiciones farmacéuticas en la terapia combinada para el tratamiento o para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis.

En una realización, la estatina lipofílica en el kit de la invención se selecciona del grupo que consiste en atorvastatina, simvastatina, fluvastatina, lovastatina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. En una realización particular, la estatina es simvastatina. En otra

realización el inhibidor de DHFR es MTX.

Cada principio activo en el kit de la invención, inhibidor de DHFR y estatina lipofílica, puede estar formulado en una unidad de dosificación para administración por vía oral. En una
5 realización particular, la unidad de dosificación para administración oral es un comprimido, píldora, pastilla, tableta, cápsula, solución, suspensión, gel o gelatina. En otra realización, cada principio activo en el kit de la invención está formulado en una unidad de dosificación para administración por vía intravenosa, intramuscular, transdérmica, rectal, intracavitaria o inhalada.

10

Una realización particular proporciona un kit que comprende MTX en una composición formulada en una unidad de dosificación que contiene 0,5 mg a 20 g de MTX junto con excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables, una estatina lipofílica en una composición formulada en una unidad de dosificación que contiene de 10 a 100 mg de
15 estatina lipofílica junto con excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables, y las instrucciones necesarias para la administración de ambas composiciones en terapia combinada para el tratamiento o prevención de recidivas de una de las enfermedades arriba mencionadas. En una realización, la unidad de dosificación de MTX contiene de 1 a 3 mg de MTX. En otra realización, la unidad de dosificación de MTX contiene de 12 a 15 g de MTX.

20

En ambos casos la unidad de dosificación de estatina lipofílica puede contener una dosis de choque inicial comprendida de 40 a 80 mg o una dosis de mantenimiento comprendida de 10 a 30 mg, por ejemplo 20 mg. Dichas instrucciones para la administración de las composiciones en terapia combinada pueden indicar, entre otras cosas, que las composiciones de MTX y estatina lipofílica se administren de manera simultánea, o bien que
25 se administren de forma separada según un intervalo terapéuticamente efectivo. Las instrucciones pueden indicar también el régimen de administración para la terapia combinada, especificando las unidades de dosificación a administrar y los intervalos de tiempo en los que se debe administrar cada una de ellas. Las dosis e intervalos de tiempo dependerán de si el kit es para el tratamiento de la enfermedad o para prevenir la recaída del paciente. Para establecer el régimen de administración de la composición de la
30 invención se pueden tener en cuenta las recomendaciones de dosis descritas más arriba para el tratamiento combinado de la invención.

35

Las instrucciones también pueden indicar la enfermedad objeto de la terapia combinada. En una realización el kit es para el tratamiento del cáncer. En otra realización el kit es para

prevenir las recidivas en pacientes que han sido tratados de cáncer. En una realización particular, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en osteosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, linfoma de células grandes, linfoma de alto grado, linfoma no Hodgking, linfosarcoma, linfoma de Burkitt, carcinoma de mama, tumor epidermoide de cabeza, tumor epidermoide de cuello, mesotelioma pleural, carcinoma pulmonar de células pequeñas, y cáncer de la vejiga urinaria. En una realización particular el cáncer es osteosarcoma. En una realización el kit es para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En otra realización el kit es para la prevención de recidivas de una enfermedad autoinmune. En una realización particular, la enfermedad autoinmune es psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Representación gráfica del efecto citotóxico en las células HOS del tratamiento combinado de MTX y simvastatina. Fue evaluado mediante el ensayo de la sulforrodamina B, usando una dosis fija de simvastatina subóptima de 0,5 μ M, combinado con el MTX (barras negras, gráfico A; y círculos negros, gráfico B) o usando sólo dosis crecientes de MTX, hasta una concentración máxima de 100 nM durante 48 horas (barras blancas, gráfico A; y círculos blancos, gráfico B) sin la simvastatina. Se tomaron medidas por triplicados y los datos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar. En ordenadas se representa la supervivencia expresado en tanto por ciento y en abscisas la concentración de MTX.

Figura 2: Representación de la tabla en las que se resumen los porcentajes de supervivencia entre el tratamiento sin (columna A) y con simvastatina (columna B) y la

diferencia entre ambos (columna C) de células HOS a una concentración de 0,5 μM de simvastatina. La columna de la izquierda representa las dosis empleadas de MTX.

Figura 3: Representación gráfica del efecto citotóxico sobre células HOS del tratamiento combinado de MTX y simvastatina. Fue evaluado mediante el ensayo de la sulforrodamina B, usando una dosis fija de simvastatina subóptima de 1 μM , combinado con el metotrexato (barras negras, gráfico A; y círculos negros, gráfico B) o usando sólo dosis crecientes de metotrexato, hasta una concentración máxima de 100 nM durante 48 horas (barras blancas, gráfico A; y círculos blancos, gráfico B) sin la simvastatina. Se tomaron medidas por triplicados y los datos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar. En ordenadas se representa la supervivencia expresado en tanto por ciento y en abscisas la concentración de MTX.

Figura 4: Representación gráfica (A) y de la tabla (B) en las que se resumen los porcentajes de supervivencia de células HOS entre el tratamiento sin (1) y con simvastatina (2) y la diferencia entre ambos (3) a una concentración de 1 μM simvastatina. La columna de la izquierda representa las dosis empleadas de MTX.

Figura 5: Representación gráfica (A) y de la tabla (B) en las que se resumen las diferencias (3) en los porcentajes de supervivencia de células HOS entre los tratamientos con simvastatina a dosis de 0,5 μM (1) y de 1 μM (2). La columna de la izquierda representa las dosis empleadas de MTX.

Figura 6: Representación gráfica en la que se evalúa la capacidad proliferativa de las células de osteosarcoma HOS sometidas a tratamiento con 0,5 μM simvastatina (2), con 50 nM metotrexato (3) o con ambos (4) respecto a las células control (1) durante 72 horas (eje de abscisas). El efecto fue evaluado mediante el conteo del número total de células (viables y no viables) en la cámara de Neubauer (eje de ordenadas) mediante la técnica del marcaje con el Tripán Blue. Se tomaron medidas por triplicados y los datos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar.

Figura 7: Representación gráfica en la que se evalúa la inducción de muerte celular en las células de osteosarcoma HOS sometidas a tratamiento con 0,5 μM simvastatina (2), con 50 nM metotrexato (3) o con ambos (2) durante 72 horas (eje de abscisas) en relación a los controles (1). El efecto fue evaluado mediante el conteo del número de células no viables en la

cámara de Neubauer (eje de ordenadas) mediante la técnica del marcaje con el Tripán Blue. Se tomaron medidas por triplicados y los datos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar.

5 Figura 8: Representación gráfica de los cambios morfológicos de las células de osteosarcoma HOS sometidas a tratamiento con 0,5 μ M simvastatina (2), con 50 nM metotrexato (3) o con ambos (4) durante 48 (panel A) y 72 horas (panel B), respecto a los controles (1). Obsérvese como el MTX (3) produce células agrandadas e incluso con dos núcleos (flecha continua); la SV (2) produce células redondeadas (flecha discontinua); y
10 ambas drogas (4) producen ambos efectos.

Figura 9: Representación gráfica de la evolución del número total de las células de osteosarcoma HOS (A) o del número de células muertas (B) sometidas a tratamiento con 1 μ M de simvastatina (2), con 100 nM de metotrexato (3) o con ambos (4) durante 48 horas en
15 relación al control (1). El efecto fue evaluado mediante el conteo del número total de células (eje de ordenadas de la gráfica A) y de las Tripán Blue positivas (eje de ordenadas de la gráfica B) en la cámara de Neubauer mediante la técnica del marcaje con el Tripán Blue. Se tomaron medidas por triplicados y los datos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar.

20 Figura 10: Representación gráfica de la evolución del número total de las células de osteosarcoma HOS (A) o del número de células muertas (B) sometidas a tratamiento con 0,5 μ M de simvastatina (2), con 50 nM de metotrexato (3) o con ambos (4) durante 72 horas en relación al control (1). El efecto fue evaluado mediante el conteo del número total de
25 células (eje de ordenadas de la gráfica A) y de las Tripán Blue positivas (eje de ordenadas de la gráfica B) en la cámara de Neubauer mediante la técnica del marcaje con el Tripán Blue. Se tomaron medidas por triplicados y los datos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar.

30 Figura 11: Representación gráfica de los cambios en el ciclo celular de las células HOS tratadas a dosis crecientes de MTX durante 24 horas. G1. 1 = control (en todos los dibujos control implica 0 nM); 2 = 10 nM; 3 = 50 nM; 4 = 100 nM; 5 = 200 nM Destaca la caída en la fase S y en el número de células en fase G2/M, con acúmulo subsiguiente en la fase G1.

35 Figura 12: (A) Representación gráfica de los cambios en el ciclo celular de las células HOS

tratadas a dosis crecientes de MTX durante 24 horas. En abscisas se representan las concentraciones de MTX: 1 = control; 2 = 10 nM; 3 = 50 nM; 4 = 100 nM; y 5 = 200 nM. (B) Valores absolutos en cada una de las fases del ciclo a las concentraciones de MTX anteriormente referidas. (C) Diferencias porcentuales de los valores obtenidos en cada fase del ciclo respecto al control. a = 10 nM vs control; b = 50 nM vs control; c = 100 nM vs control; y d = 200 nM vs control. La caída en la fase S osciló entre un 9,38% y un 35,46% respecto al control. La fase G2/M descendió entre un 6,30% y un 55,46% respecto al control, mientras que las células en fase G1 se incrementó su número entre un 1,89% y un 42,00% respecto al control.

10

Figura 13: Representación gráfica de los cambios en el ciclo celular de las células HOS tratadas a dosis crecientes de SV durante 24 horas. 1 = control; 2 = 0,2 μ M; 3 = 0,5 μ M; 4 = 1 μ M; 5 = 2 μ M; 6 = 5 μ M; y 7 = 10 μ M. Destaca la caída en la fase S y en el número de células en fase G1, con acúmulo subsiguiente en la fase G2/M.

15

Figura 14: Representación gráfica de los cambios en el ciclo celular de las células HOS tratadas a dosis crecientes de SV durante 24 horas. En abscisas se representan las concentraciones de SV: 1 = control; 2 = 0,2 μ M; 3 = 0,5 μ M; 4 = 1 μ M; 5 = 2 μ M; 6 = 5 μ M; y 7 = 10 μ M. (B) Valores absolutos en cada una de las fases del ciclo a las concentraciones de SV anteriormente referidas. (C) Diferencias porcentuales de los valores obtenidos en cada fase del ciclo respecto al control. a = 0,2 μ M vs control; b = 0,5 μ M vs control; c = 1 μ M vs control; d = 2 μ M vs control; e = 5 μ M vs control; y f = 10 μ M vs control. La caída en la fase S osciló entre un 0,41% y un 22,53% respecto al control. La caída en la fase G1 osciló entre un 7,85% y un 48,28% respecto al control. La fase G2/M ascendió entre un 9,32% y un 97,65% respecto al control.

20

25

Figura 15: Representación gráfica de los cambios en el ciclo celular de las células HOS tratadas una combinación de SV y de MTX durante 24 horas. En abscisas se representan las concentraciones de los fármacos: 1 = control; 2 = SV 1 μ M; 3 = MTX 50nM; 4 = SV 1 μ M + MTX 50 nM. (B) Valores absolutos en cada una de las fases del ciclo a las concentraciones anteriormente referidas. (C) Diferencias porcentuales de los valores obtenidos en cada fase del ciclo respecto al control. a = SV 1 μ M vs control; b = MTX 50 nM vs control; c ambos vs control. La caída en la fase S osciló entre un 4,10% y un 12,10% respecto al control. La fase G1 descendió un 19,60 con la SV, pero aumento un 15,11% respecto al control cuando se combinó con el MTX. En la fase G2/M se acumuló un 40,92%

30

35

cuando se trató sólo con SV, pero descendió un 33,90% respecto al control cuando se combinó con el MTX.

Figura 16: Representación gráfica de los cambios en el pico SubG0 de las células HOS tratadas con MTX durante 48 horas. 1 = control; 2 = MTX 10 nM; 3 = MTX 20 nM; 4 = MTX 50 nM; 5 = MTX 100 nM; 6 = MTX 200 nM. Destaca el importante cambio en el perfil de la región G1-G2/M y la aparición incipiente del pico SubGo a una concentración de MTX 20 nM (3), indicativo de muerte celular por apoptosis.

Figura 17: (A) Representación gráfica de los cambios en el pico SubG0 y en la región G1-G2/M de las células HOS tratadas a dosis crecientes de MTX durante 48 horas. En abscisas se representan las concentraciones de MTX: 1 = control; 2 = 10 nM; 3 = 20 nM; 4 = 50 nM; 5 = 100 nM; y 6 = 200 nM. (B) Valores absolutos en cada una de las regiones estudiadas a las concentraciones de MTX anteriormente referidas. (C) Incrementos o disminuciones de los valores obtenidos en cada una de las regiones estudiadas respecto al control. a = 10 nM vs control; b = 20 nM vs control; c = 50 nM vs control; d = 100 nM vs control; y e = 200 nM vs control. Destaca el importante incremento en el número de células cuantificadas en la fase SubG0 a dosis superiores a los 50 nM de MTX.

Figura 18: Representación gráfica de los cambios en el pico SubG0 de las células HOS tratadas con SV durante 48 horas. 1 = control; 2 = SV 0,2 μ M; 3 = SV 0,5 μ M; 4 = SV 1,0 μ M; 5 = SV 2,0 μ M; 6 = SV 5,0 μ M; 7 = SV 10 μ M. Destaca el importante cambio en el perfil de la región G1-G2/M y la aparición del pico SubGo a una concentración tan baja de SV 0,2 μ M (2), siendo máxima a 10 μ M de SV, indicativo de muerte celular por apoptosis.

Figura 19: (A) Representación gráfica de los cambios en el pico SubG0 y en la región G1-G2/M de las células HOS tratadas a dosis crecientes de SV durante 48 horas. En abscisas se representan las concentraciones de SV: 1 = control; 2 = 0,2 μ M; 3 = 0,5 μ M; 4 = 1,0 μ M; 5 = 2,0 μ M; 6 = 5,0 μ M; y 7 = 10 μ M. (B) Valores absolutos en cada una de las regiones estudiadas a las concentraciones de SV anteriormente referidas. (C) Incrementos o disminuciones de los valores obtenidos en cada una de las regiones estudiadas respecto al control. a = 0,2 μ M vs control; b = 0,5 μ M vs control; c = 1,0 μ M vs control; d = 2,0 μ M vs control; e = 5,0 μ M vs control; y F = 10 μ M vs control. Destaca el importante incremento en el número de células cuantificadas en la fase SubG0 a dosis superiores a los 0,2 μ M de SV.

35

Figura 20: (A) Representación de los histogramas de los cambios en el pico SubG0 y la región G1-G2/M de las células HOS tratadas una combinación de SV y de MTX durante 48 horas. 1 = control; 2 = MTX 30 nM ; 3 = SV 0,5 µM; 4 = MTX 30 nM + SV 0,5 µM.

- 5 Figura 21: (A) Representación gráfica de los cambios en el pico SubG0 y la región G1-G2/M en las células tratadas con una combinación de SV y de MTX durante 48 horas. En abscisas se representan las concentraciones de los fármacos: 1 = control; 2 = MTX 30nM ; 3 = SV 0,5 µM; 4 = MTX 30 nM + SV 0,5 µM. (B) Valores absolutos en el pico SubG0 y la región G1-G2/M a las concentraciones de los fármacos: 1 = control; 2 = MTX 30nM ; 3 = SV 0,5 µM; 4 = MTX 30 nM + SV 0,5 µM. (C) Incrementos o disminuciones de los valores obtenidos en cada una de las regiones estudiadas respecto al control. a = MTX 30 nM vs control ; b = SV 0,5 µM vs control; c ambos vs control. Destaca un incremento de hasta 6 veces el número de células en el pico SubG0 (muerte celular) cuando se combinan ambos tratamientos.
- 10
- 15 Figura 22: Representación gráfica de los cambios en la apoptosis celular de las células HOS a las 24 horas (A) y a las 36 horas (B) con la técnica de DNA ladder. 1 = control; 2 = SV 0,5 µM; 3 = MTX 50nM; 4 = MTX 50 nM + SV 0,5 µM.

EJEMPLOS

20

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no han de ser interpretados como limitativos del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente para fines de ilustración y no se pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

25

Ejemplo 1. Cultivo de líneas celulares de osteosarcoma

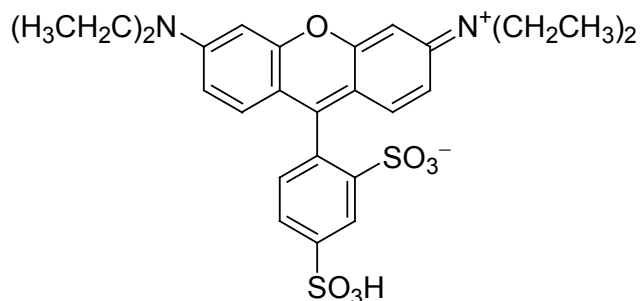
- 30 La línea celular de osteosarcoma de rata UMR-106 y humana HOS se cultivaron en medio RPMI 1640. La línea celular de osteosarcoma humana MG-63 se cultivó en medio DMEN. Todos los medios de cultivo se suplementaron con el FBS al 10%, 2 mM glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las condiciones de mantenimiento de todas las líneas celulares empleadas fueron 37° C en una atmósfera humidificada con 5%
- 35 CO₂. Las líneas tumorales se obtuvieron desde ATCC (American Type Culture Collection) y

se cultivaron acorde las condiciones recomendadas.

Ejemplo 2. Ensayo de supervivencia celular.

- 5 Las líneas celulares de osteosarcoma se cultivaron con dosis de MTX de 10, 20, 30, 40, 50 60, 80 y 100 nM y la simvastatina a dosis de 0,5 μ M y 1 μ M. La supervivencia celular se cuantificó mediante la técnica de la sulforrodamina B (SRB), que es un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica basado en la unión electrostática de la SRB a los aminoácidos básicos fijados con ácido tricloroacético (TCA).

10



Estructura de la SRB.

- 15 Para ello, las líneas celulares tumorales UMR-106, HOS, MG-63 se cultivaron a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en 200 μ l de medio de cultivo suplementado con 10% FBS en placas noventa y seis pocillos y crecidas durante 24, 48 o 72 horas. Una vez terminado el experimento se retiró el medio por decantación. Tras añadir 50 μ l /pocillo de TCA (100 mL TCA 100% (p/v) + 900 mL H₂O Elix, 2-5° C) al 10 % frío, se incubó durante 30 minutos a 4° C para fijar completamente las células al fondo del pocillo. Luego se eliminó el
- 20 TCA por decantación y se lavó suavemente con agua fría corriente al menos 4 veces, garantizando que todos los pocillos se lavaban por igual. A continuación se invirtieron las placas y se pusieron boca abajo contra varias capas de papel secante de manos, garantizando la eliminación de casi toda el agua hasta el día siguiente. A continuación se añadió 40 μ l de una solución de Sulforrodamina B (Sigma S-9012, 4 gr SRB + 1 L de Acético al 1% (vol/vol), a temperatura ambiente) al 0,4 % (peso/vol) en 1% (vol/vol) de Ácido acético, evitando hacerlo con luz directa (la SRB es fotosensible). Se dejó incubando a
- 25 temperatura ambiente 30 minutos. Seguidamente se decantó el colorante y se lavaron los pocillos al menos 4 veces con Ácido Acético al 1% (vol/vol, 100 mL Acético + 10L H₂O Elix.), asegurándonos de eliminar cualquier traza de colorante que no esté unido a las células.
- 30 Luego se eliminaron los restos de Acético sacudiendo con firmeza contra varias capas de

papel secante hasta el día siguiente en oscuridad. Se añadieron 150 µl de TRIS:BASE 10 mM (pH 10,5, 100 mL TRIS:Base 100mM + 900 mL de H₂O Hellix) y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente para garantizar que se disolvía completamente el colorante. Por último, se realizó la medición en el Dual Lector multiplaca a 492 nm (pico absorción de la SRB) y a 620 nm (para eliminar posibles interferencias provocadas por pequeñas variaciones de volumen, suciedad o imperfecciones de la placa). Antes de la medición es necesario realizar una agitación rápida de la placa.

Los resultados de los ensayos de supervivencia celular pueden observarse en las figuras 1-5. Los resultados reflejan que la simvastatina permite disminuir significativamente la dosis efectiva del MTX cuando se co-administran. Este efecto es especialmente relevante a concentraciones bajas de MTX, entre 0 y 30 nM de MTX.

Ejemplo 3. Ensayo de viabilidad celular.

Las células HOS se cultivaron en medio de cultivo suplementado con 5-10 % de suero fetal bovino inactivado por calor y 2 mM en L-glutamina, a 37 °C, 95% de humedad y 5% de atmósfera de CO₂. Las células fueron tratadas con 0,5 µM de simvastatina y con 50 nM de MTX durante 24, 48 y 72 horas. Las células se recogieron por tripsinización. Para ello, primero se aspiró el medio de cultivo; se lavaron las células con 2–3 mL de PBS (estéril); se añadió 0,5–1 mL de disolución de tripsina-EDTA (estéril); se incubó a 37° C durante 5 minutos; se recogieron las células con 5 mL de medio de cultivo fresco; y se colocó la suspensión en un tubo de 15 mL estéril. Para determinar la viabilidad celular se empleó la tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Para ello, se mezcla en un tubo de 1,5 mL, 50 µL de disolución de azul tripán y 50 µL de suspensión de células. Se homogeneiza la mezcla y se colocan 10 µL en cámara de Neubauer. Se cuentan las células totales y las células no viables (teñidas completamente de azul).

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular pueden observarse en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10.

De estos experimentos se concluye que la simvastatina tiene un efecto predominante sobre la inducción de muerte celular; que el metotrexato afecta preferentemente al freno de la

proliferación celular; y que cuando se aplican ambos tratamientos, se produce más freno de la proliferación y más muerte celular que cuando ambos tratamientos se administran por separado.

5 Ejemplo 4. Detección de apoptosis.

La detección y cuantificación de apoptosis se llevó a cabo mediante el ensayo de la fragmentación del ADN y mediante citometría de flujo con Anexina-V/IP.

10 4.1. Ensayo de la fragmentación del ADN (Ladder DNA). La línea celular tumoral UMR-106 se cultivó a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos durante dos y tres días. Seguidamente, el cultivo celular se incubó con simvastatina a $0,5 \mu\text{M}$ y MTX 50 nM durante 24 y 48 horas. Después de la obtención de las células en cada condición experimental en tubos de microcentrifuga, las células se lisaron en $200 \mu\text{l}$ de tampón
15 conteniendo Tris/Hcl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM , Tritón X-100 $0,2\%$ y se centrifugaron a $12.000 \times g$ durante veinte minutos en la microcentrifuga Biofuge Stratos, Heraeus Instruments. Las muestras se incubaron con RNasa (Sigma) para eliminar su contenido en RNA, a la concentración final de 5 mg/ml durante una hora a 37° C y con proteinasa K (Sigma) (20 mg/ml) durante una hora a 37° C . Después de varios lavados cuyo componente
20 principal era el fenol, las muestras se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20° C durante 12 horas como mínimo. Nuevamente se centrifugó a $12.000 \times g$ y se lavaron las condiciones experimentales con etanol 70% para añadir $50 \mu\text{l}$ de Buffer TE conteniendo Tris/Hcl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0. Se analizaron en un gel de agarosa 1% . El contenido de DNA de 123 bp fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante un
25 sistema con luz UV (Bio Imaging System-Syngene). Los análisis densitométricos se llevaron a cabo usando un software de dominio público Scion Image Beta 4.02 para Windows.

Los resultados del ensayo de fragmentación del ADN pueden observarse en la figura 22. Obsérvese la potenciación de la respuesta apoptótica cuando las células se tratan con SV y
30 MTX.

4.2. Citometría de flujo con Anexina-V/IP. Para detectar y cuantificar las células bajo condiciones de apoptosis se empleó el kit AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit (Ref: 556547, Becton Dickinson Pharmingen TM). Las células se sembraron en placas de 6
35 pocillos durante tres días. Se trataron con simvastatina a $0,5 \mu\text{M}$ y MTX 50 nM durante 24 y

48 horas. Después se incubaron con 100 µl del tampón de unión que contiene 4 µl de anexina conjugada con isotiocianato de fluoroceína (anexinaV-FITC) y 10 µl de yoduro de propidio durante quince minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se resuspendieron en 400 µl del mismo tampón de unión y conservadas en la oscuridad. Se analizaron mediante citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) y los histogramas se cuantificaron mediante el software Cell Quest (Becton Dickinson). Bajo estas condiciones y con el fin de distinguir los procesos apoptóticos de los procesos necróticos y de descartar la viabilidad celular, cada uno de los resultados se ha representado bajo la siguiente formulación:

10

$$\% \text{ células} = \text{Anexina V-FITC}^+ \text{ IP}^- / \text{IP}^-$$

Siendo IP- la suma de las células consideradas como viables (Anexina V-FITC- IP-) y las células que se encuentran en estadios de apoptosis temprana (Anexina V-FITC+ IP-).

15

Los resultados de los ensayos de apoptosis mediante citometría de flujo pueden observarse en las figuras 16-22. Los resultados indican que la combinación de los dos fármacos induce mayor muerte celular que cuando se administran por separado.

20 5. Análisis del ciclo celular.

Para analizar los cambios en la distribución del ciclo celular, las células se sembraron y se trataron bajo las mismas condiciones que las empleadas con la tinción anexina-V. Las células tratadas y no tratadas se resuspendieron en NP-40 al 1% disuelto en PBS conteniendo, además, 50 µg/ml de IP a la densidad de 3×10^5 células/muestra. Después de 15 minutos de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, se llevaron a cabo el análisis y la cuantificación de cada una de las condiciones experimentales siguiendo la misma metodología que la empleada en los experimentos de apoptosis por tinción con anexina-V (citómetro de flujo FACSCalibur y software Cell Quest).

30

Los resultados de los estudios de cambios en la distribución del ciclo celular pueden observarse en las figuras 11-15. Los resultados indican que el MTX provoca esencialmente una parada del ciclo en fase G1; que la SV para el ciclo en fase G2/M; y que la combinación de ambos para el ciclo en ambas fases con una caída importante en la síntesis de ADN, evitando con la combinación que la célula pueda escapar del control sobre el ciclo celular.

35

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis, donde dicho tratamiento o prevención comprende administrar a un sujeto de manera simultánea, separada o secuencial una estatina lipofílica y el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa.
2. Uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dematomiositis y sarcoidosis , donde dicho medicamento es para uso en terapia combinada con una estatina lipofílica.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el cual el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa se administra simultáneamente con la estatina lipofílica.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el cual el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa y la estatina lipofílica se administran de forma separada, en cualquier orden y con un intervalo terapéuticamente efectivo.
5. Uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y de una estatina lipofílica para la preparación de un medicamento para el tratamiento o para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el cual el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa es metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el cual el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa se administra con una frecuencia comprendida de 1 y 5 semanas y la estatina lipofílica se administra con una frecuencia comprendida de 1 y 7 días.

5

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el cual la estatina lipofílica se selecciona del grupo que consiste en simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, lovastatina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

10 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el cual el cáncer se selecciona del grupo que consiste en osteosarcoma, corioadenoma destruens, coriocarcinoma, mola hidatidiforme, leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, linfoma de células grandes, linfoma de alto grado, linfoma de alto grado, linfoma no Hodking, linfosarcoma, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneo, cáncer de mama, cáncer de ovario, tumor epidermoide de cabeza, tumor epidermoide de cuello, mesotelioma pleural, carcinoma pulmonar de células pequeñas y cáncer de la vejiga urinaria.

15

10. Uso según la reivindicación 9, en el cual cuando el cáncer es leucemia linfocítica aguda se administra una cantidad del inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa comprendida de 1 a 3 mg/m² de superficie corporal y una cantidad de estatina lipofílica comprendida de 20 a 80 mg/ m² de superficie corporal.

20

11. Uso según la reivindicación 9, donde cuando el cáncer es osteosarcoma se administra una cantidad del inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa comprendida de 12 a 15 g/m² de superficie corporal y una cantidad de estatina lipofílica comprendida de 20 a 80 mg/ m² de superficie corporal.

25

12. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una estatina lipofílica junto con excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

30

13. Composición según la reivindicación 12, en la cual el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa es metotrexato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-13 que es para administración por vía oral.

15. Composición según la reivindicación 14, la cual está formulada en forma de comprimido.

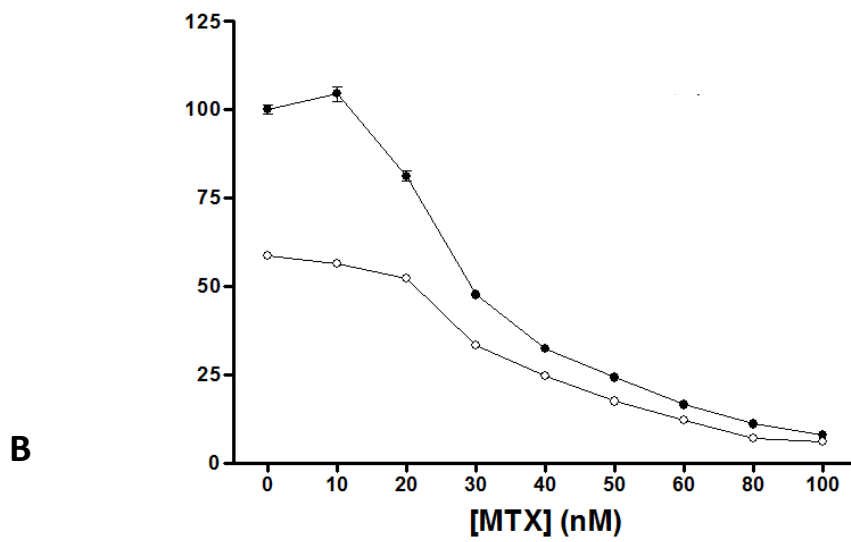
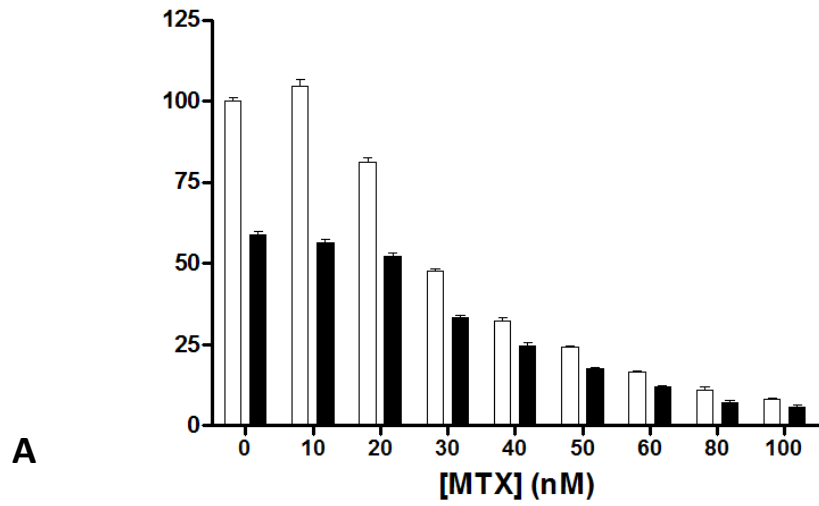
5

16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-13 que es para administración por vía intravenosa, intramuscular, transdérmica, rectal, intracavitaria, o inhalada.

10 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-16, la cual está formulada en una unidad de dosificación que comprende de 1 mg a 15 g del inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa y de 20 a 80 mg de estatina lipofílica.

15 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en la cual la estatina lipofílica se selecciona del grupo que consiste en simvastatina, fluvastatina, atorvastatina, lovastatina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

19. Un kit que comprende una primera composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una segunda composición farmacéutica que comprende una estatina lipofílica; e instrucciones para el uso de ambas composiciones farmacéuticas en la terapia combinada para el tratamiento o para la prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, psoriasis, artritis psoriásica, artritis juvenil poliarticular, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, polimiositis, dermatomiositis y sarcoidosis.



		B	C
Control	100,00	58,73	41,27
10 nM	104,52	56,46	48,06
20 nM	81,16	52,31	28,85
30 nM	47,62	33,30	14,32
40 nM	32,43	24,66	7,76
50 nM	24,12	17,50	6,63
60 nM	16,49	12,14	4,35
80 nM	11,07	6,99	4,08
100 nM	8,06	5,92	2,14

Figura 2

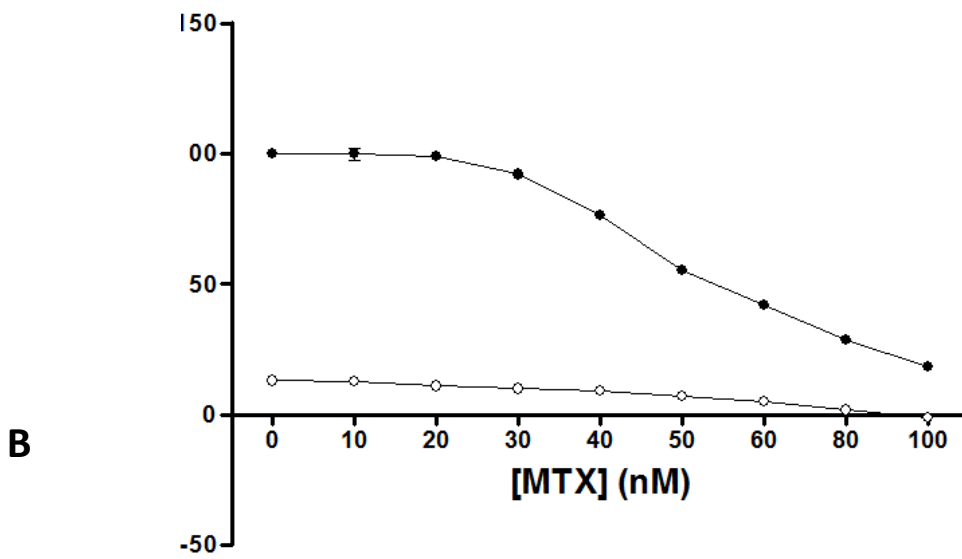
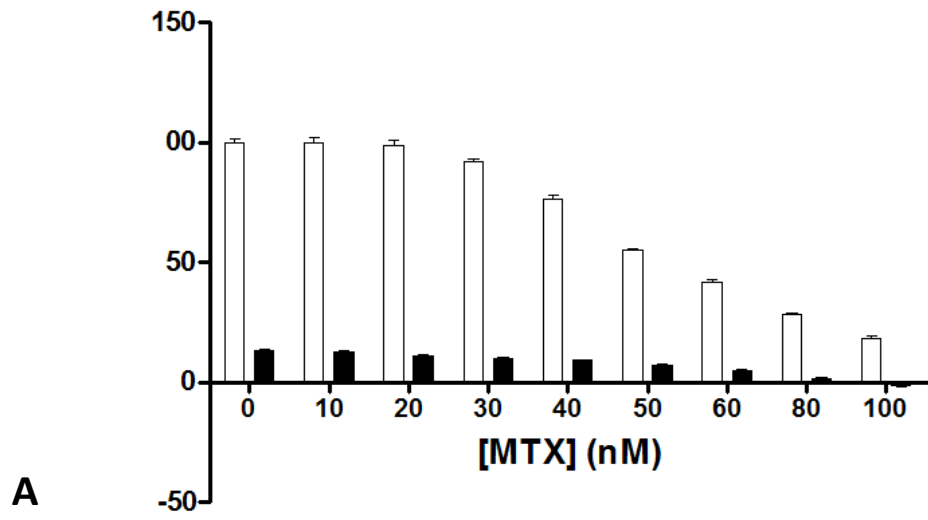


Figura 3

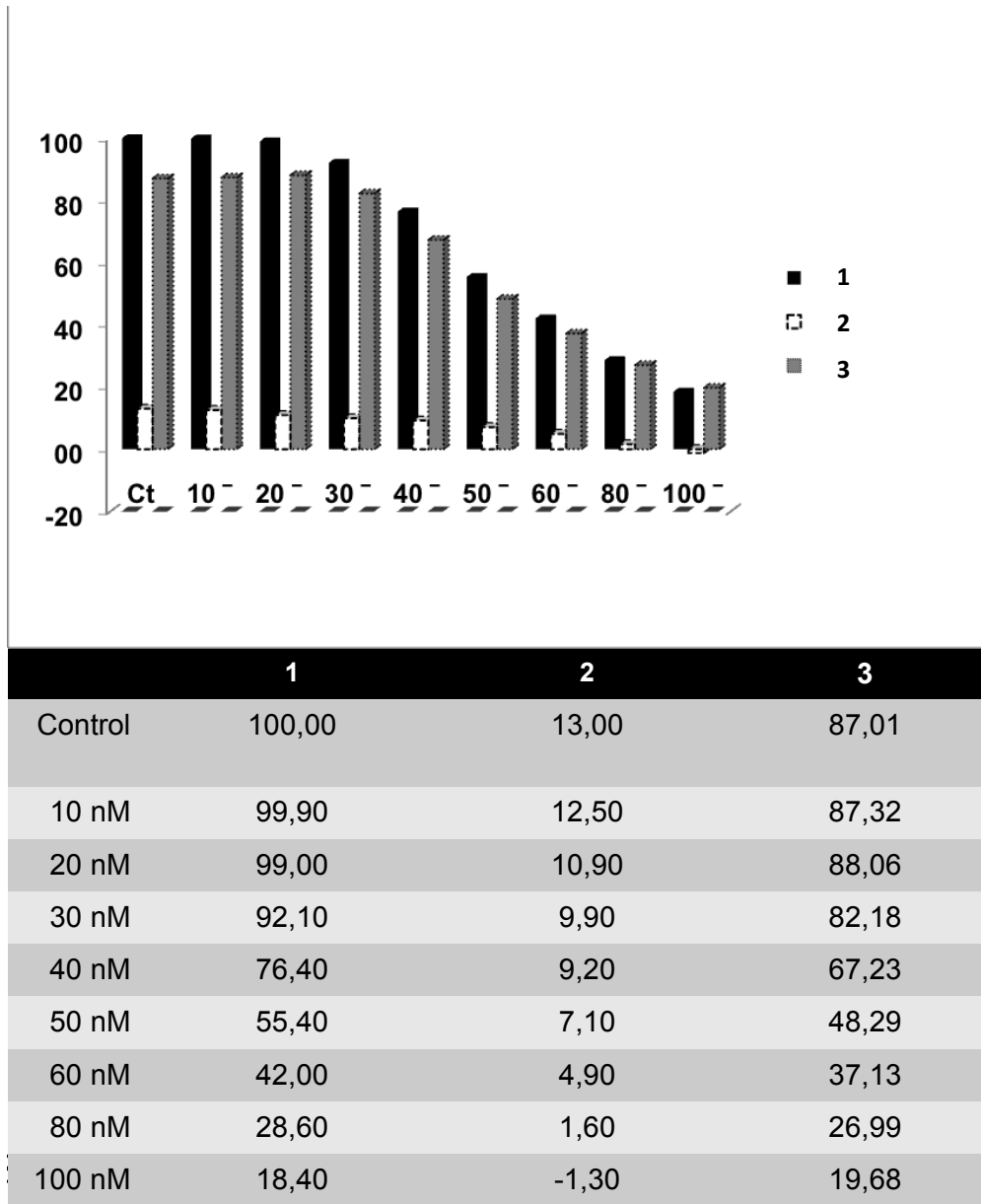


Figura 4

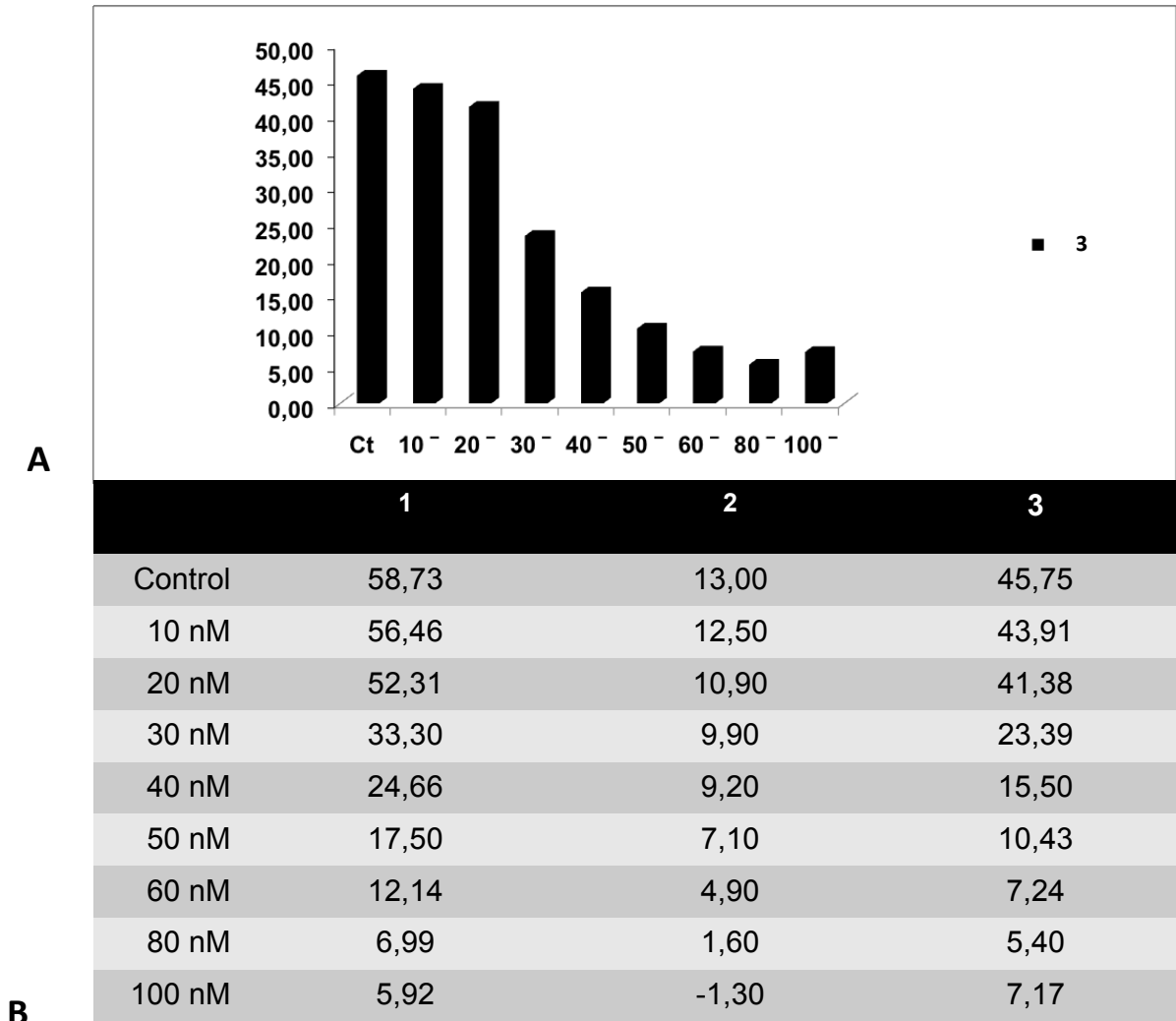


Figura 5

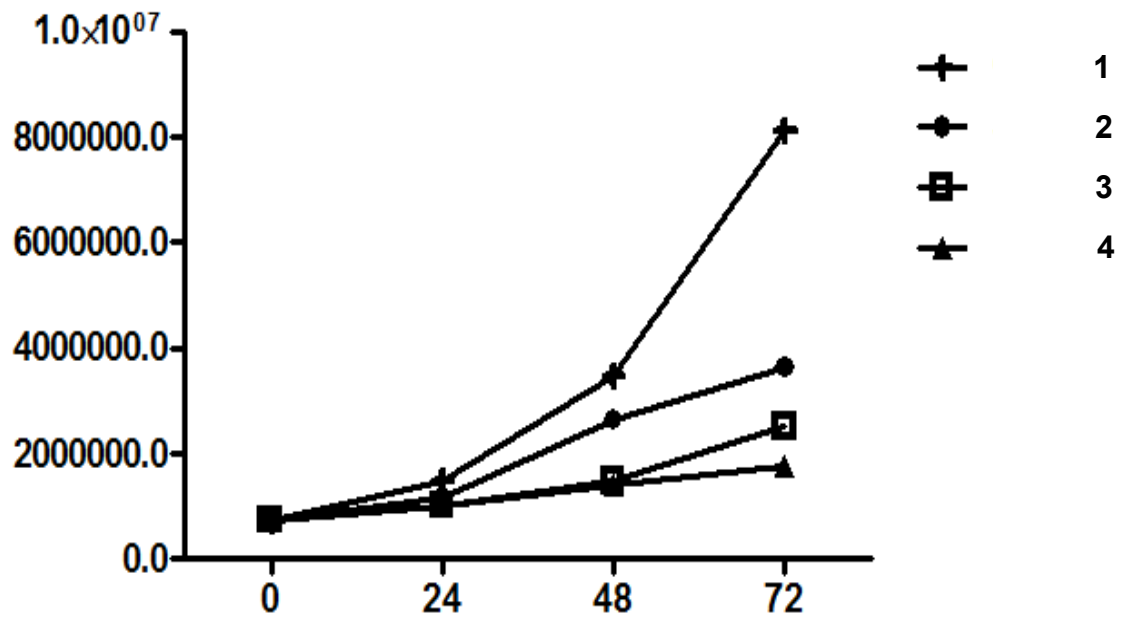


Figura 6

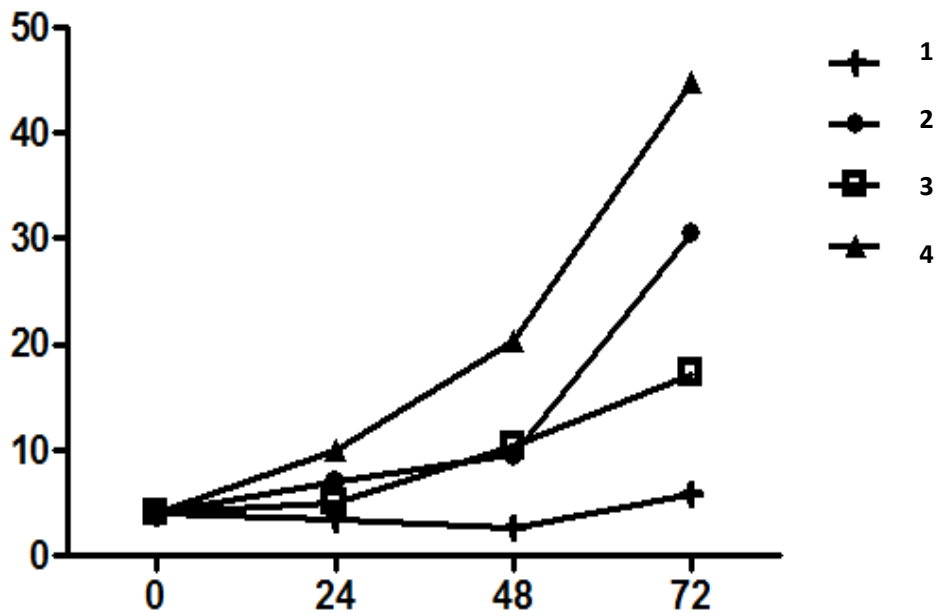


Figura 7

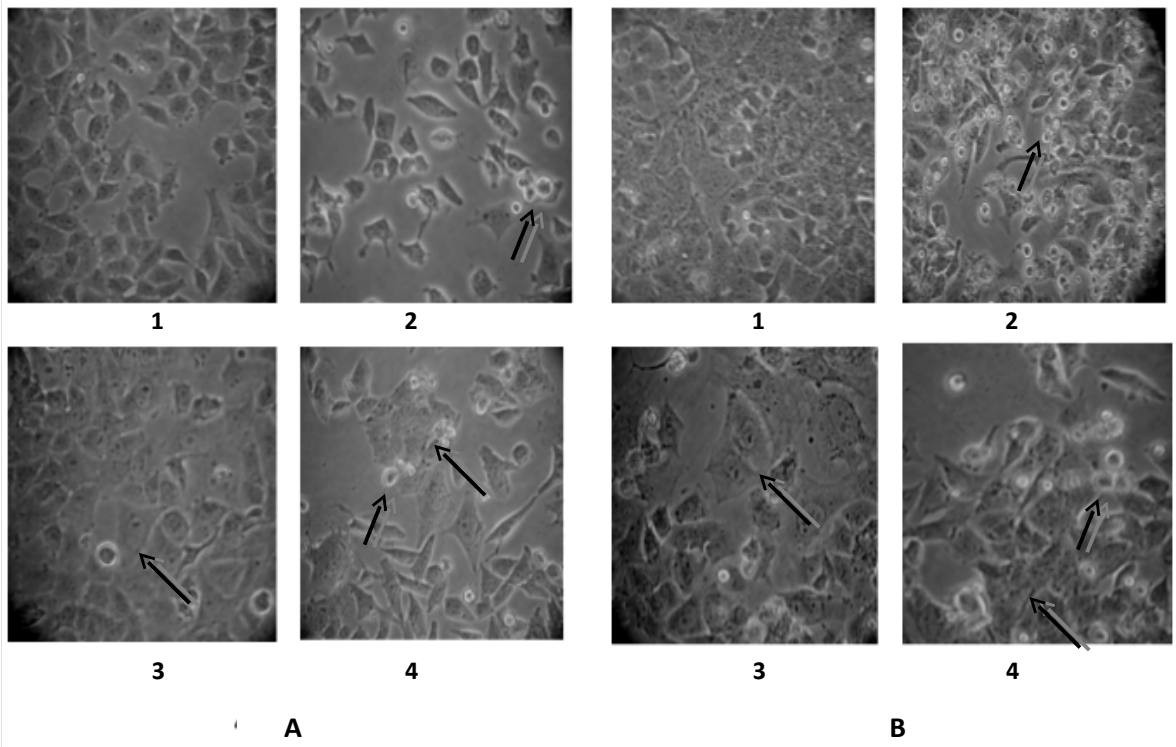


Figura 8

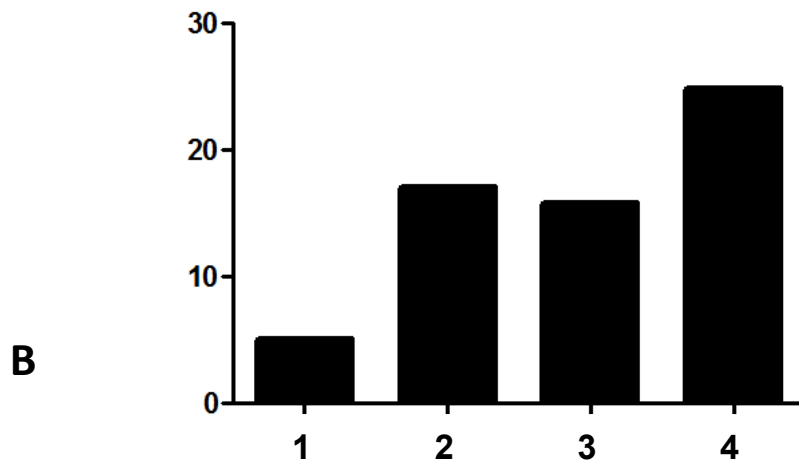
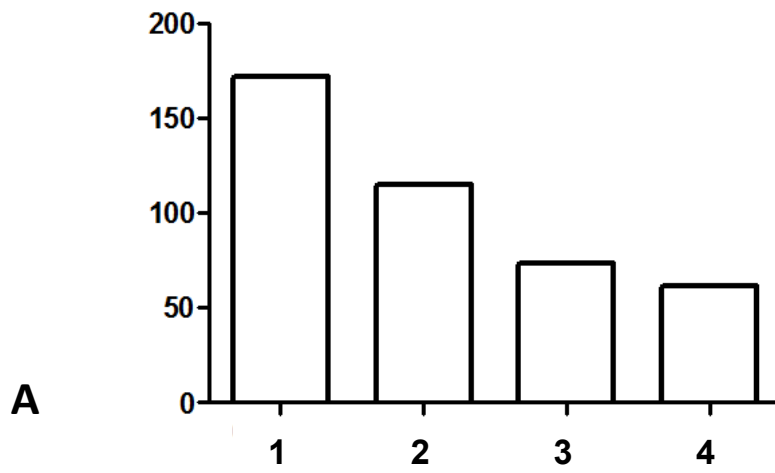


Figura 9

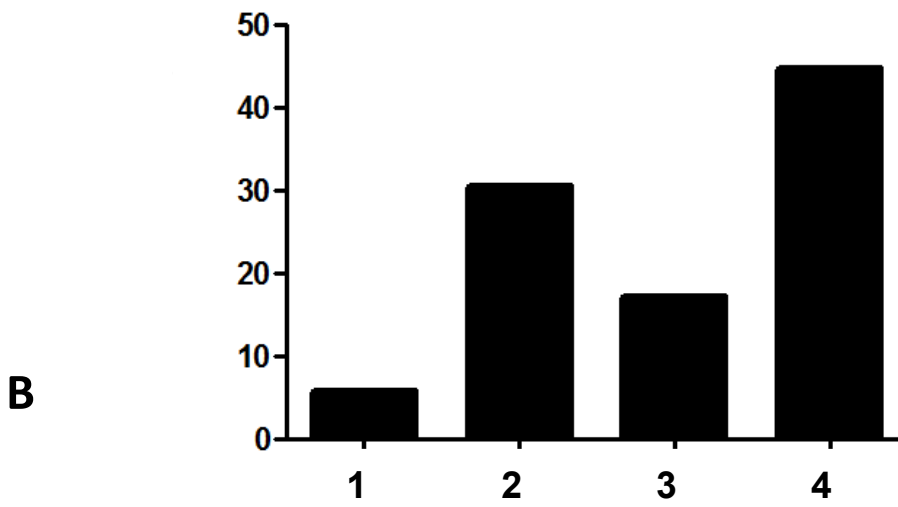
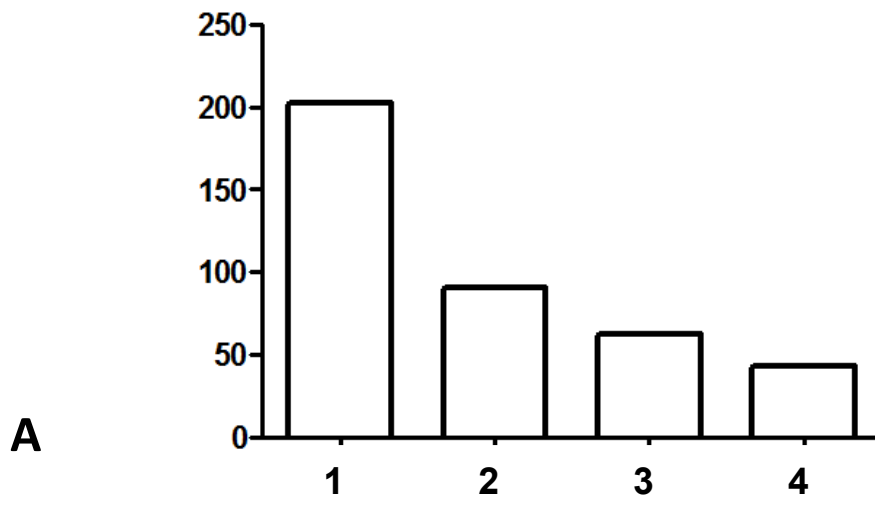


Figura 10

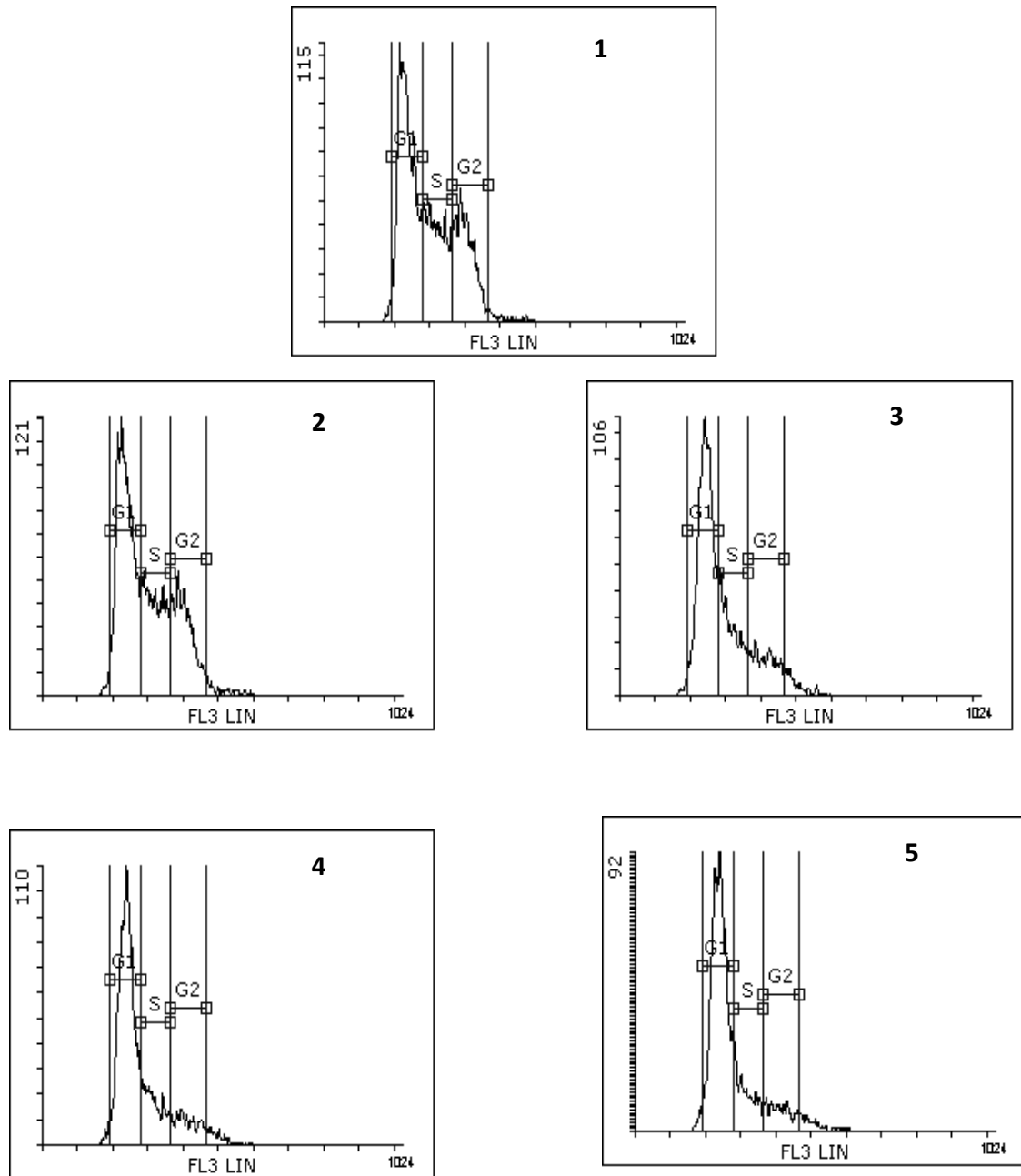


Figura 11

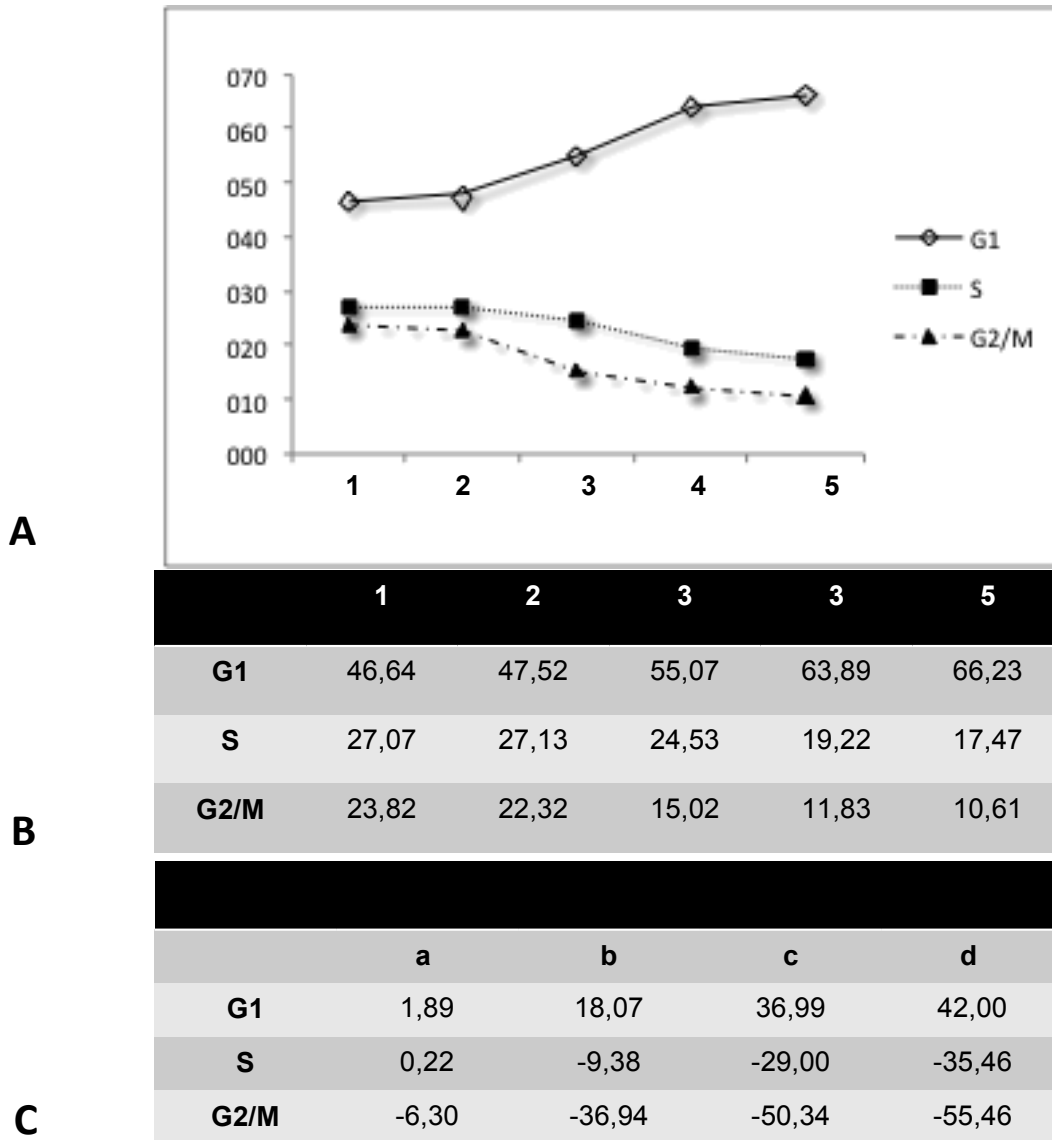


Figura 12

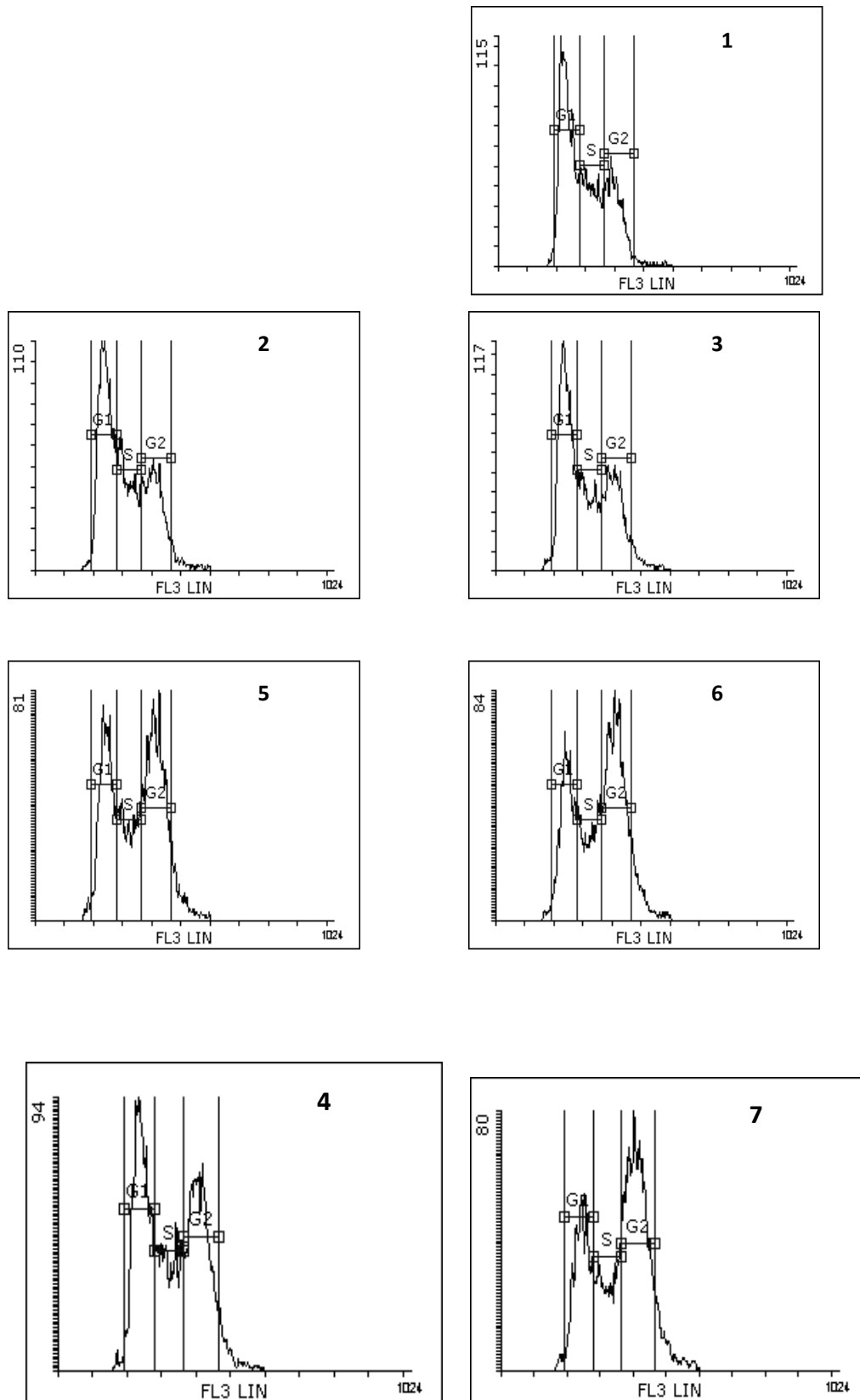


Figura 13

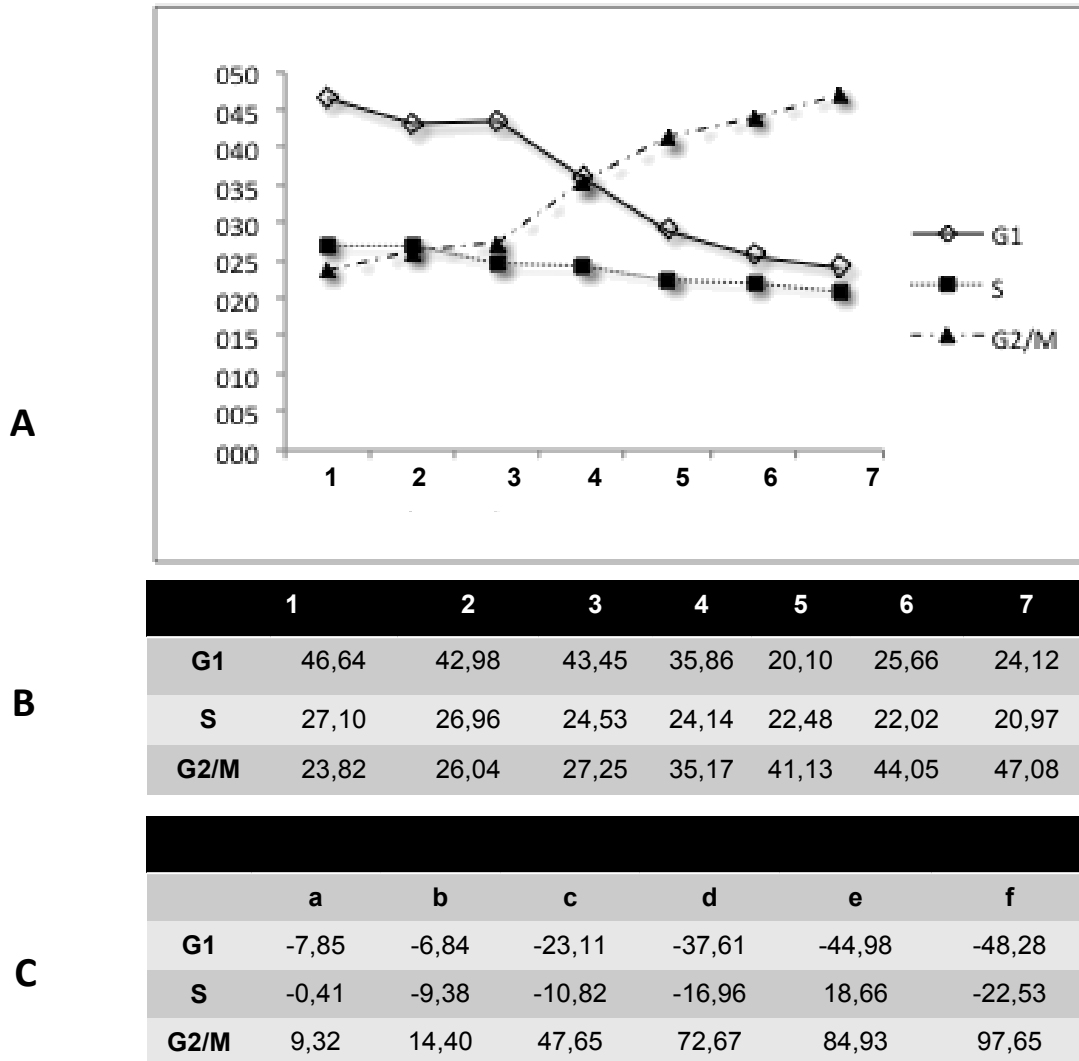
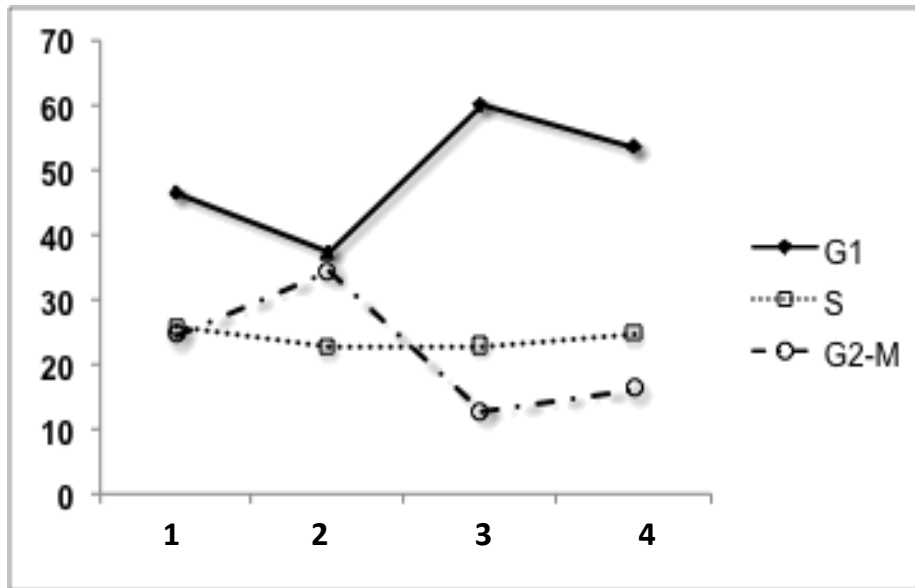


Figura 14



A

	1	2	3	4
G1	46,40	37,31	60,05	53,41
S	25,83	22,71	23,13	24,77
G2/M	24,39	34,37	12,71	16,13

B

	a	b	c
G1	-19,60	29,42	15,11
S	-12,10	-10,45	-4,10
G2/M	40,92	-47,90	-33,90

C

Figura 15

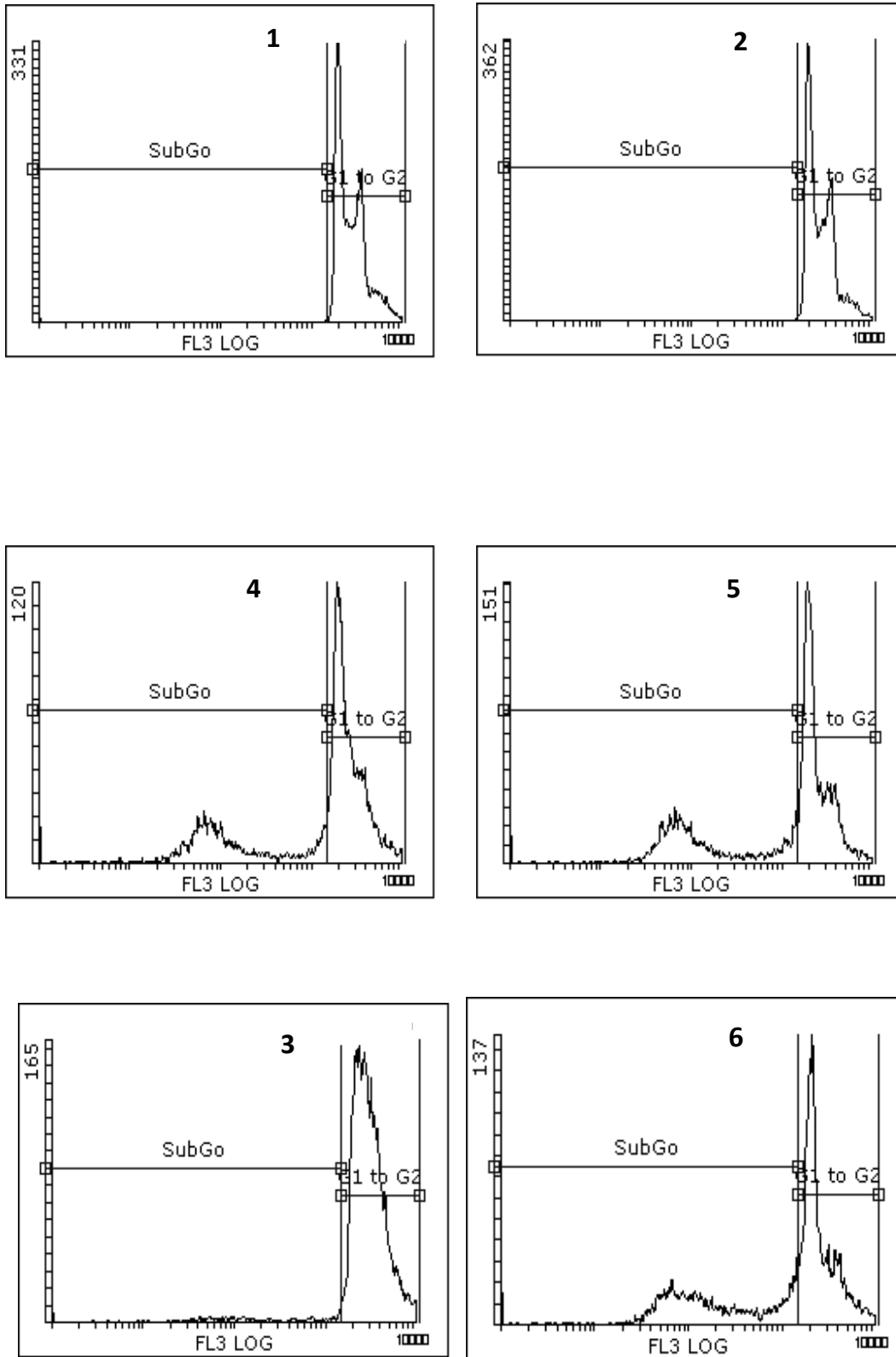


Figura 16

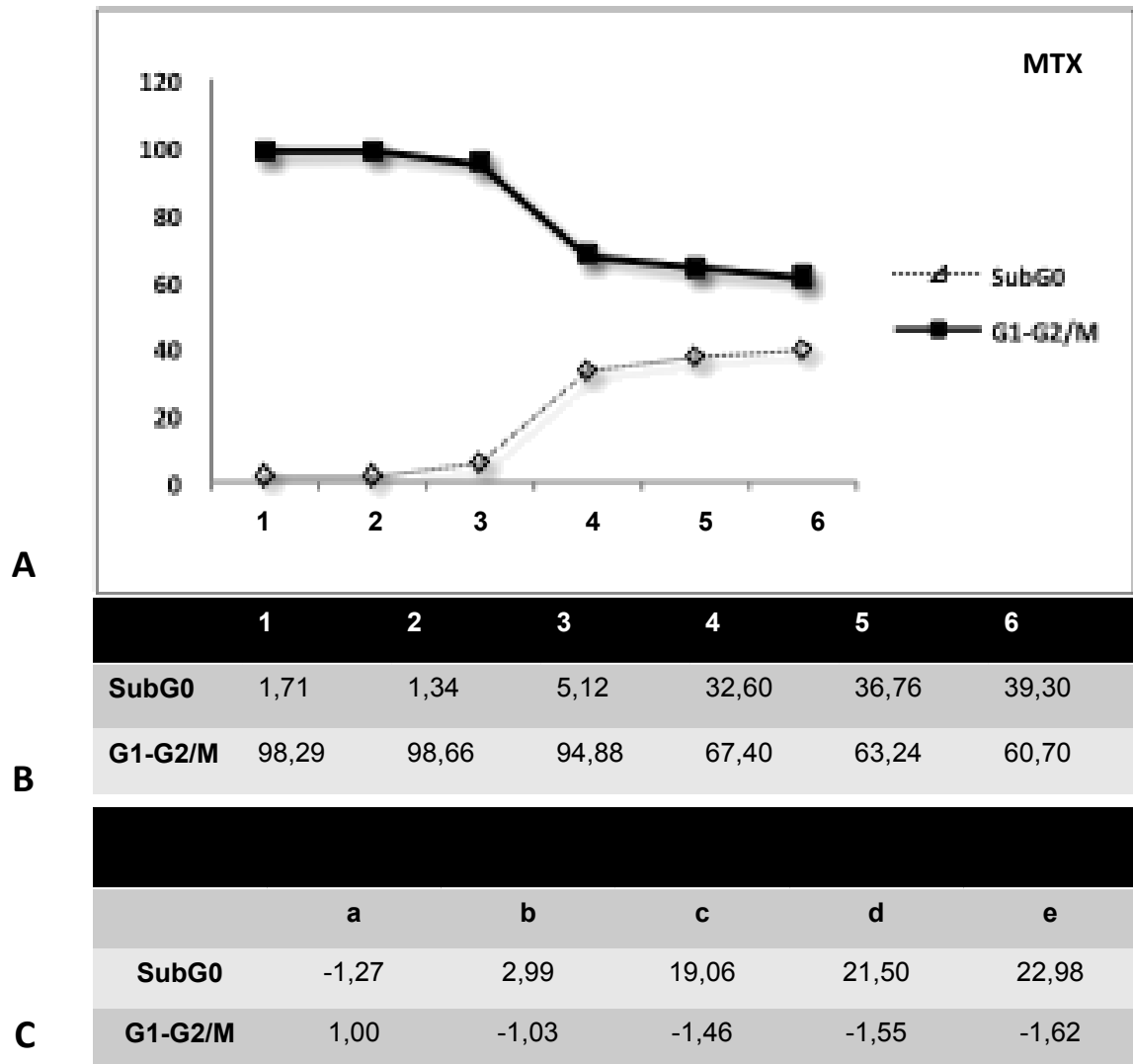


Figura 17

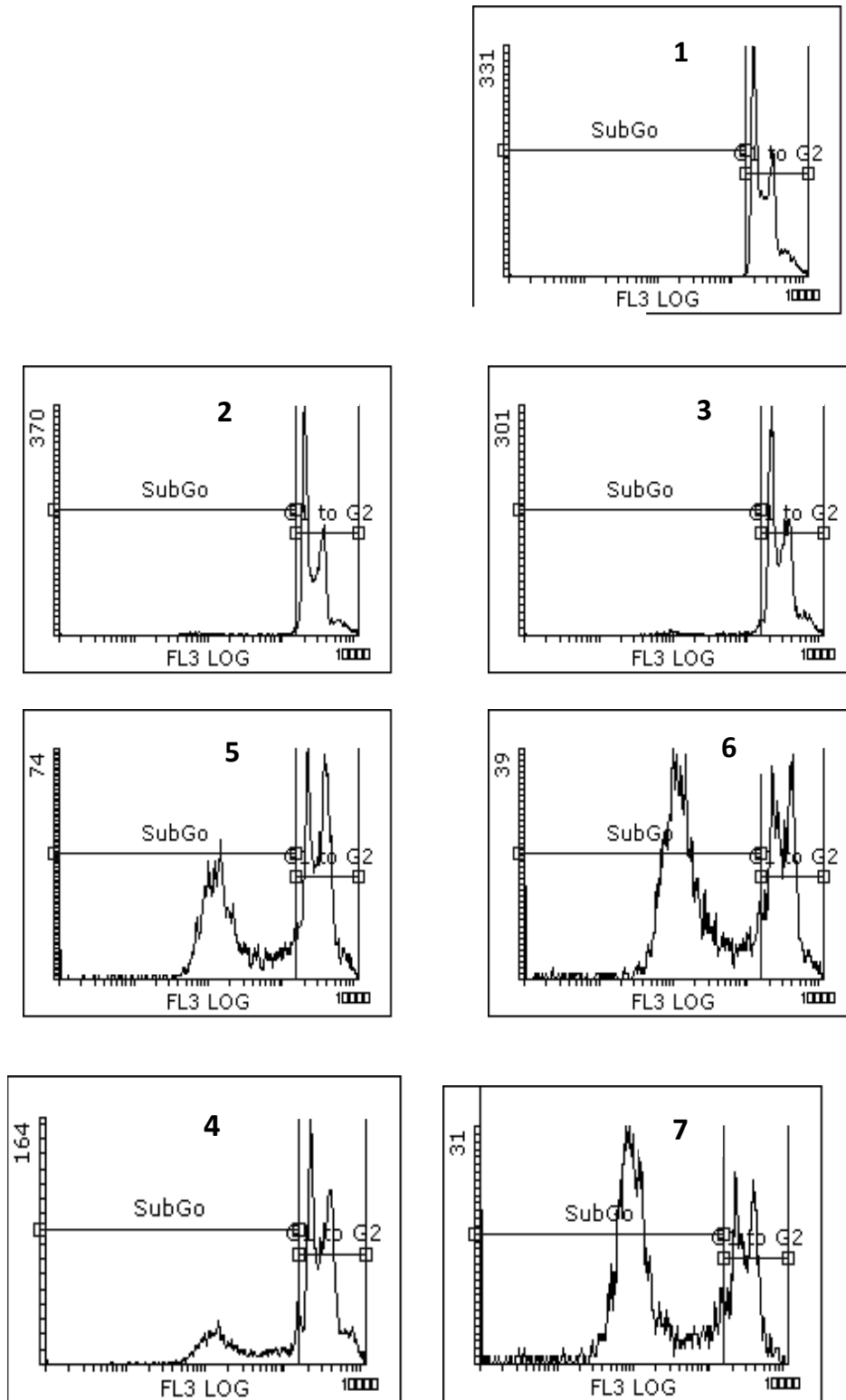
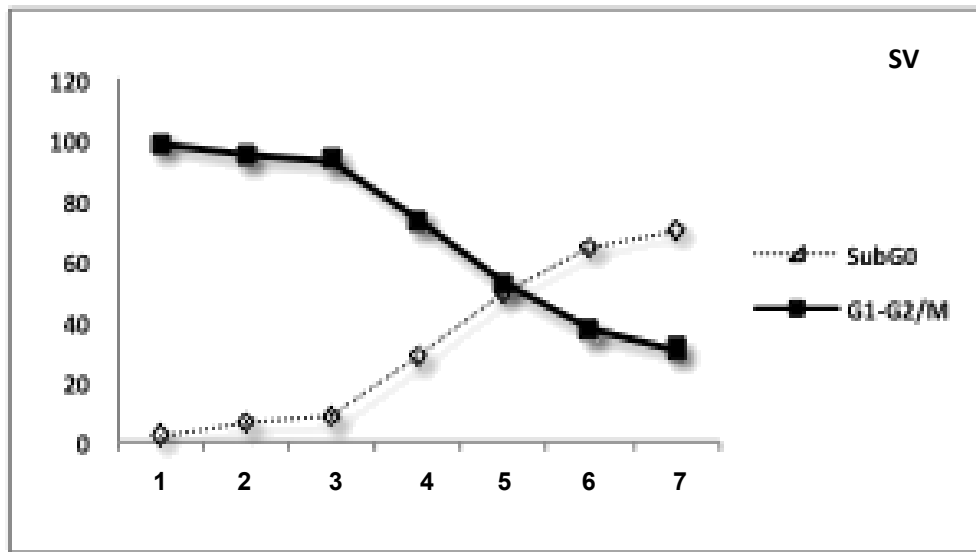


Figura 18



A

	2	3	4	5	6	7	
SubG0	1,71	5,69	7,15	24,71	48,71	63,77	69,76
G1-G2/M	98,29	94,31	92,85	72,59	51,29	36,23	30,24

B

	a	b	c	d	e	f
SubG0	3,32	4,18	14,45	28,48	37,30	40,80
G1-G2/M	-1,04	-1,06	-1,35	-1,92	-2,71	-3,25

C

Figura 19

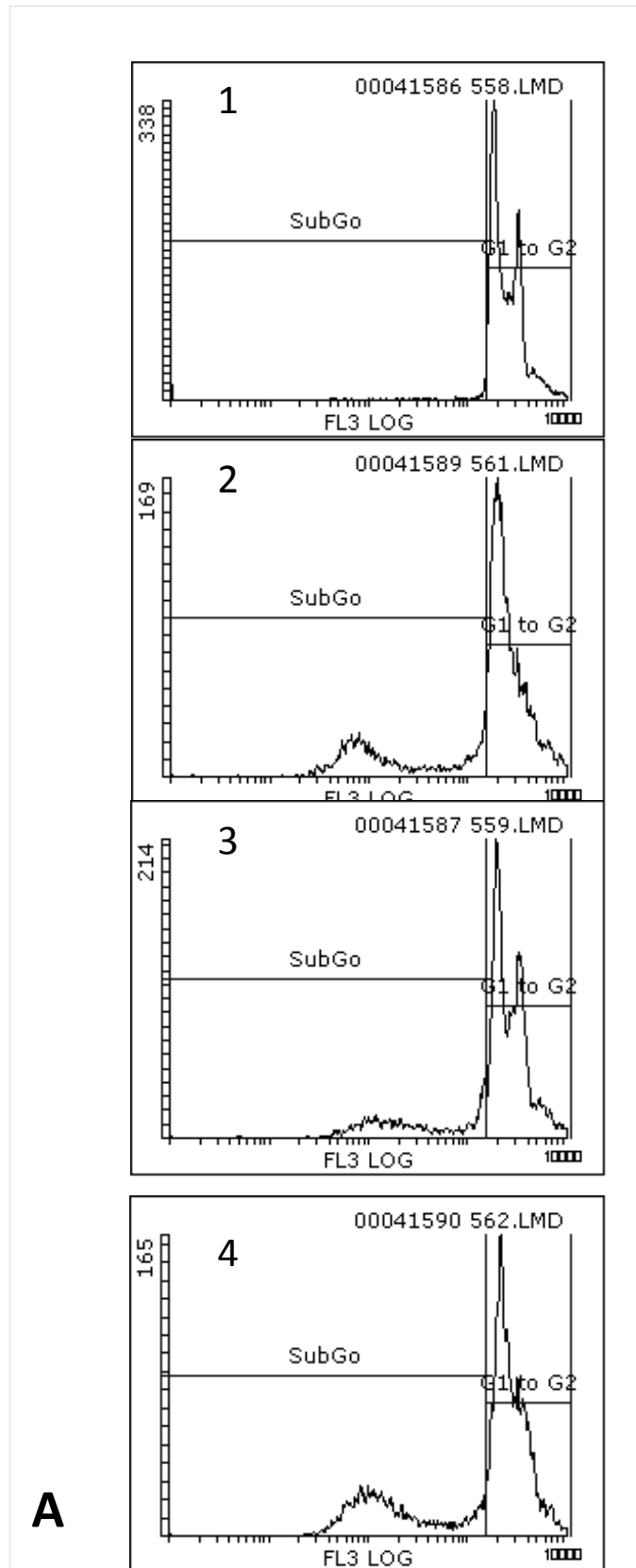


Figura 20

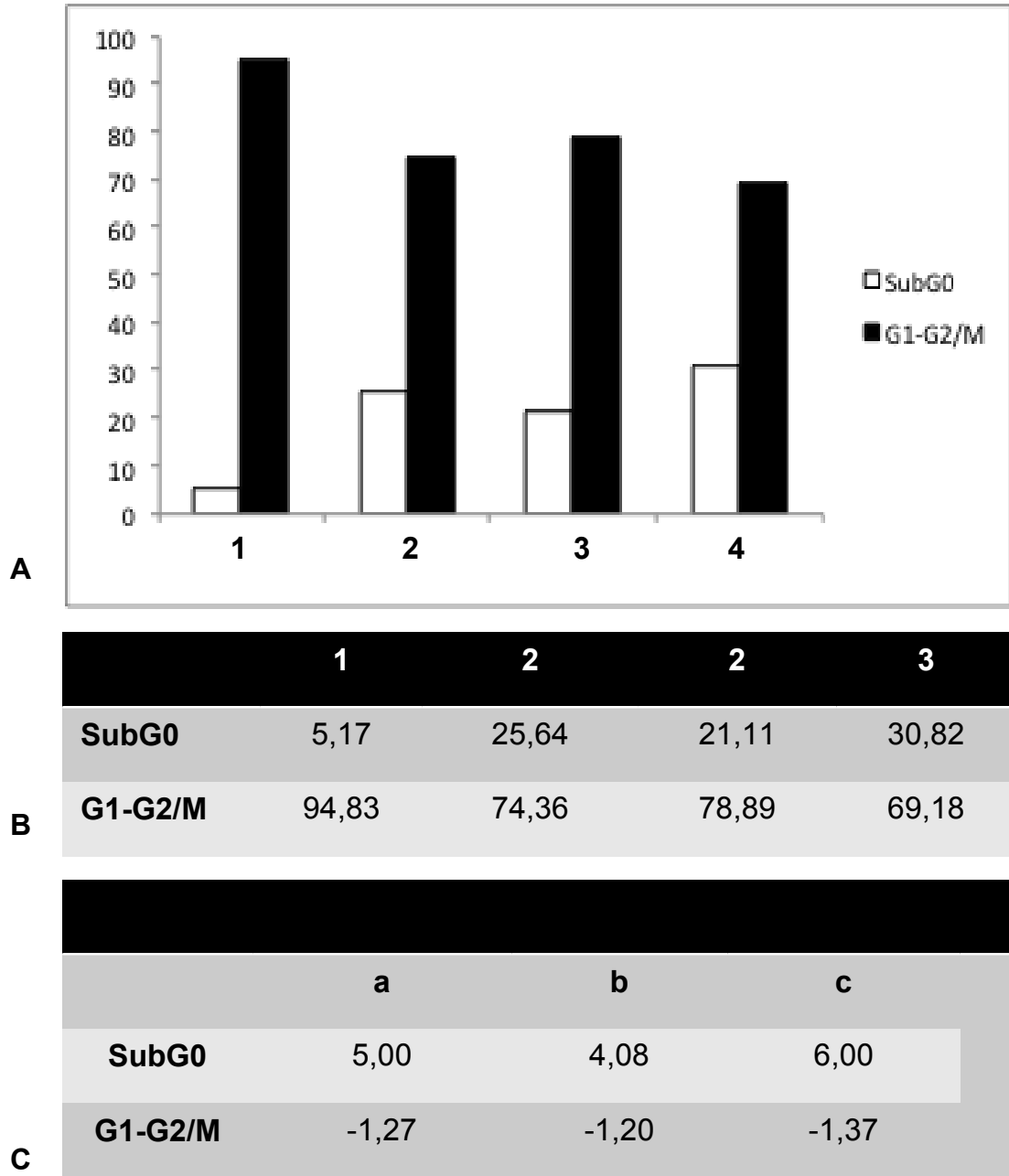


Figura 21

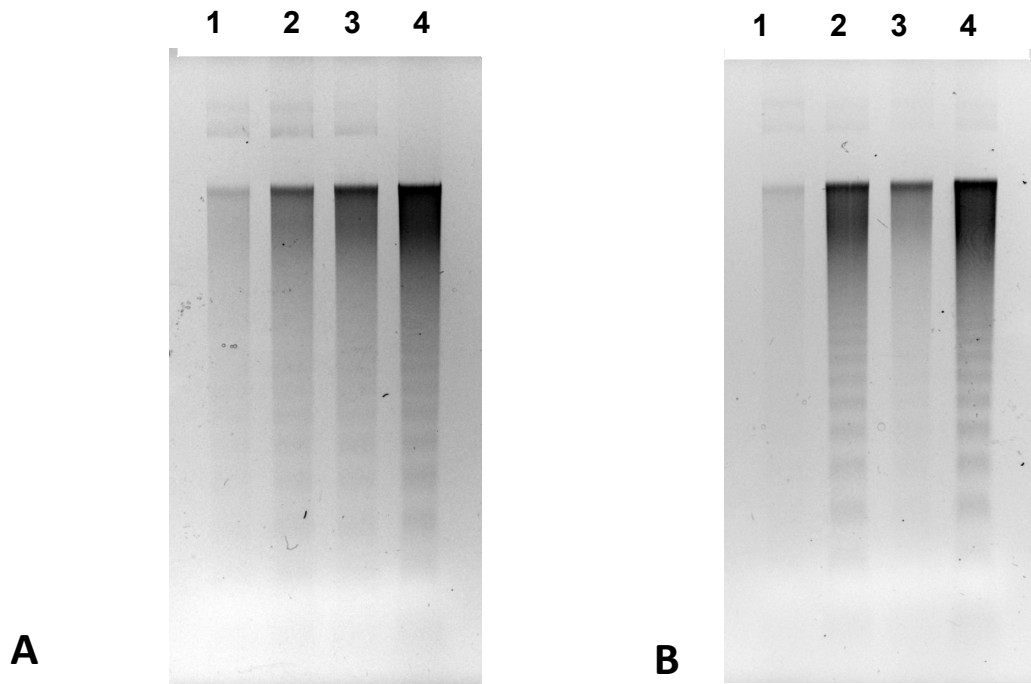


Figura 22



- ②① N.º solicitud: 201331207
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.08.2013
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/519** (2006.01)
A61P19/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ABUD-MENDOZA C et al. Therapy with statins in patients with refractory rheumatic diseases: a preliminary study. Lupus England 2003 VOL: 12 No: 8 Págs: 607-611 ISSN 0961-2033 (Print) Doi: pubmed:12945719, resumen; página 607, columna 2, último párrafo; página 608, columna 2, párrafo 1; página 611, columna 1, último párrafo.	1-8,12-19
X	US 2004013643 A1 (MACH FRANCOIS) 22.01.2004, reivindicaciones 5,7,8,37-39.	12-19

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
22.05.2014

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

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

A61K, A61P

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, NPL, EMBASE, MEDLINE, NPL, BIOSIS, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.05.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 9-11	SI
	Reivindicaciones 1-8, 12-19	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 9-11	SI
	Reivindicaciones 1-8,12-19	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	ABUD-MENDOZA C et al. Therapy with statins in patients with refractory rheumatic diseases: a preliminary study..Lupus England 2003 VOL: 12 No: 8 Págs: 607-611 ISSN 0961-2033 (Print) Doi: pubmed:12945719, resumen; página 607, columna 2, último párrafo; página 608, columna 2, párrafo 1; página 611, columna 1, último párrafo.	30.11.2002
D02	US 2004013643 A1 (MACH FRANCOIS)	22.01.2004

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 se refiere al uso de un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, trimetrexato y pemetrexed, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de recidivas de una enfermedad seleccionada entre cáncer, psoriasis, artritis de diferentes tipos, etc. Dicho tratamiento consiste en administrar a un sujeto de manera simultánea, secuencial o separada una estatina lipofílica y el inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa. Se reivindica la composición farmacéutica que contiene ambos compuestos y el kit que los contiene.

En el documento D1 se realiza un estudio en pacientes con artritis reumatoide a los que se les administraba metotrexato (2.5 mg /día) siendo la respuesta poco satisfactoria. Se observa que la adición de estatinas (simvastatina, 40 mg/día) a la terapia inmunosupresora normal, mejora los parámetros clínicos en pacientes con lupus eritematoso, artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias (ver resumen, página 607, columna 2, último párrafo, página 608, columna 2, párrafo 1 y página 611, columna 1, último párrafo).

El documento D2 se refiere al uso de estatinas inmunomoduladores. Más específicamente a los métodos de tratamiento de la esclerosis múltiple con la administración de estatinas (ver reivindicaciones 5-7) y en combinación con otros agentes para tratar la esclerosis entre los que se selecciona el metotrexato (ver reivindicación 8). Se reivindica así mismo el kit que contiene una estatina y por otro lado el agente para tratar la esclerosis entre el que se encuentra el metotrexato (reivindicaciones 37-39)

Por lo tanto, a la vista de los documentos D1 y D2, la materia correspondiente a las reivindicaciones 12-19 carece de novedad ya que es conocida la composición farmacéutica de estatinas y de metotrexato para su administración tanto simultánea como secuencial (ver documentos D1 y D2). En cuanto a las reivindicaciones de uso (reivindicaciones 1-8) carecen de novedad ya que en el documento D1 se cita la utilización de dicha composición en una de las enfermedades recogidas en dichas reivindicaciones que es la artritis reumatoide.

En consecuencia, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-8,12-19 carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

En lo referente a las reivindicaciones 8-11 que se refieren al uso específico en distintos tipos de cáncer, no se encuentra referido en ninguno de los documentos citados, por lo tanto las reivindicaciones 8-11 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.