

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 180**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4995 (2006.01) **A61K 31/7072** (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01) **A61K 31/517** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 11781807 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2637663**

54 Título: **Terapia de combinación con un alcaloide antitumoral**

30 Prioridad:

12.11.2010 EP 10382300

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

09.05.2016

73 Titular/es:

**PHARMA MAR S.A. (100.0%)
Avda. de los Reyes, 1 Polígono Industrial La
Mina-Norte
28770 Colmenar Viejo, Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MONEO OCAÑA, VICTORIA;
SANTAMARÍA NÚÑEZ, GEMA;
GARCÍA FERNÁNDEZ, LUIS FRANCISCO;
GALMARINI, CARLOS MARÍA;
GUILLÉN NAVARRO, MARÍA JOSÉ y
AVILÉS MARÍN, PABLO MANUEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 569 180 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación con un alcaloide antitumoral

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a la combinación de PM01183 con antimetabolitos y al uso de estas combinaciones en el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer se desarrolla cuando empiezan a crecer fuera de control células en una parte del cuerpo. Aunque hay muchas clases de cáncer, todos surgen del crecimiento fuera de control de células anormales. Las células cancerosas pueden invadir tejidos cercanos y pueden difundirse por la corriente sanguínea y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Hay varios tipos principales de cáncer. El carcinoma es un neoplasma maligno que es un crecimiento incontrolado y anormal progresivo que surge de células epiteliales. Las células epiteliales cubren las superficies internas y externas del cuerpo, incluyendo órganos, revestimiento de vasos y otras cavidades pequeñas. El sarcoma es cáncer que surge de células en hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de soporte. La leucemia es cáncer que surge en el tejido formador de sangre tal como la médula ósea, y causa la producción de grandes números de células sanguíneas anormales y su entrada en la corriente sanguínea. Linfoma y mieloma múltiple son cánceres que surgen de células del sistema inmunitario.

15 Además, el cáncer es invasivo y tiende a infiltrar los tejidos circundantes y dar lugar a metástasis. Puede difundirse directamente a tejidos circundantes y puede difundirse también a través de los sistemas linfático y circulatorio a otras partes del cuerpo.

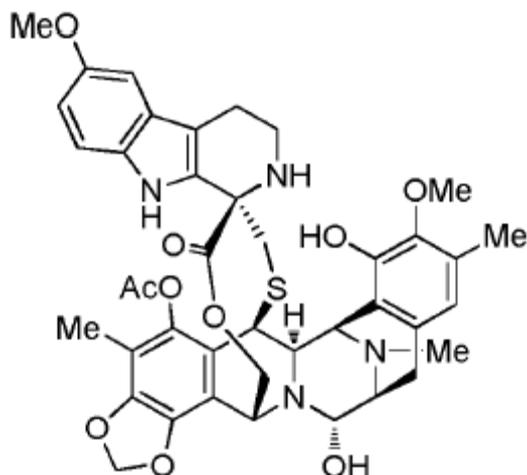
20 Están disponibles muchos tratamientos para el cáncer, incluyendo cirugía y radiación para enfermedad localizada, y quimioterapia. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos disponibles para muchos tipos de cáncer es limitada, y se necesitan nuevas formas mejoradas de tratamiento que muestren beneficios clínicos. Esto es especialmente cierto para aquellos paciente que presentan una enfermedad avanzada y/o metastásica y para pacientes recidivantes con enfermedad progresiva después de haberse tratado anteriormente con terapias establecidas que se vuelven ineficaces o intolerables debido a la adquisición de resistencia o a limitaciones en la administración de las terapias debido a las toxicidades asociadas.

25 Desde los años 50, se han hecho avances significativos en la gestión quimioterapéutica del cáncer. Desgraciadamente, más de un 50 % de todos los pacientes de cáncer no responden a la terapia inicial o experimentan recaída después de una respuesta inicial al tratamiento, y en última instancia mueren por enfermedad metastásica progresiva. Por tanto, es críticamente importante el compromiso continuo del diseño y el descubrimiento de nuevos agentes anticancerosos.

30 La quimioterapia, en su forma clásica, se ha centrado principalmente en destruir rápidamente las células cancerosas proliferantes orientándose a procesos metabólicos celulares generales, incluyendo ADN, ARN y biosíntesis de proteína. Los fármacos quimioterapéuticos se dividen en varios grupos basados en cómo afectan a sustancias químicas específicas en las células cancerosas, con cuáles actividades o procesos celulares interfiere el fármaco y a cuáles fases específicas del ciclo celular afecta el fármaco. Los tipos más comúnmente usados de fármacos quimioterapéuticos incluyen: fármacos alquilantes de ADN (tales como ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatino, carboplatino, dacarbazina), antimetabolitos (5-fluorouracilo, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gencitabina, citarabina, fludarabina), inhibidores mitóticos (tales como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina), antibióticos anticancerosos (tales como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona), inhibidores de topoisomerasa I y/o II (tales como topotecán, irinotecán, etopósido y tenipósido) y terapia hormonal (tal como tamoxifeno y flutamida). Scaife *et al.*: "Antimetabolites in Cancer Therapy" en "Anticancer Therapeutics" (2008, John Wiley & Sons) proporciona una revisión de antimetabolitos empleados comúnmente para tratar el cáncer.

45 El fármaco antitumoral ideal destruiría las células cancerosas selectivamente, con un índice amplio respecto a su toxicidad hacia células no cancerosas, y retendría también su eficacia frente a células cancerosas, incluso después de exposición prolongada al fármaco. Desgraciadamente, ninguna de las quimioterapias actuales con estos agentes plantea un perfil ideal. La mayoría plantea índices terapéuticos muy estrechos y, además, las células cancerosas expuestas a concentraciones ligeramente subletales de un agente quimioterapéutico pueden desarrollar resistencia a dicho agente, y bastante a menudo resistencia cruzada a varios otros agentes antitumorales.

50 La PM01183, también conocido como triptamicidina, es un alcaloide sintético que está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer, y tiene la siguiente estructura química:



La PM01183 ha demostrado una actividad *in vitro* muy potente contra líneas celulares tumorales sólidas y no sólidas, así como una actividad *in vivo* significativa en varias líneas celulares tumorales humanas xenoinjertadas en ratones, tales como aquellas de cáncer de mama, riñón u ovario. La PM01183 ejerce sus efectos anticancerosos mediante la modificación covalente de guaninas en el surco menor del ADN, que eventualmente dan lugar a un rotura de ADN bicatenario, detención en la fase S y apoptosis en células cancerosas. Puede encontrarse información adicional respecto a este compuesto en los documentos WO 03/01427; 100th AACR Annual Meeting, 18-22 de abril de 2009, Denver, CO, n° de resumen 2679 y n° de resumen. 4525; y Leal JFM *et al.* Br. J. Pharmacol. 2010, 161, 1099-1110.

- 5 Puesto que el cáncer es una causa principal de muerte en animales y seres humanos, se han emprendido y se siguen emprendiendo varios esfuerzos para obtener una terapia activa y segura para administrar a pacientes que padecen cáncer. El problema para resolver por la presente invención es proporcionar terapias anticancerosas que sean útiles en el tratamiento del cáncer.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 15 La materia en cuestión que no esté englobada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención actualmente reivindicada.

La presente invención establece que la PM01183 potencia la actividad antitumoral de los antimetabolitos 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed. Por lo tanto, pueden usarse PM01183 y dichos otros antimetabolitos exitosamente en terapia de combinación para el tratamiento del cáncer.

- 20 Por tanto, se dan a conocer en la presente memoria composiciones farmacéuticas, kits que usan estas terapias de combinación y usos de ambos fármacos en el tratamiento del cáncer y en la fabricación de medicamentos para terapias de combinación sinérgica.

- 25 De acuerdo con un aspecto de esta invención, la invención está dirigida a PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed.

- 30 En otro aspecto, la invención está dirigida a PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el aumento o potenciación de la eficacia terapéutica de un antimetabolito en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con su antimetabolito, en la que el antimetabolito se selecciona de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed.

- 35 Se da a conocer también en la presente memoria el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer por terapia de combinación sinérgica empleando PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un antimetabolito como se define anteriormente.

- 40 Se da a conocer también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y/o un antimetabolito como se define anteriormente, y un portador farmacéuticamente aceptable, para usar en terapia de combinación sinérgica para el tratamiento del cáncer.

La invención engloba también un kit para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende una forma de dosificación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una forma de dosificación de un antimetabolito como se define anteriormente, e instrucciones para el uso de ambos fármacos en combinación sinérgica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **Fig. 1-2.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo y gemcitabina respectivamente contra células A549.
- Fig. 3-4.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con citarabina y gemcitabina respectivamente contra células A673.
- 10 **Fig. 5-7.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina y metotrexato respectivamente contra células SK-MEL-2.
- Fig. 8-11.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células PC-3.
- Fig. 12-14.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células PANC-1.
- 15 **Fig. 15-18.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células HGC-27.
- Fig. 19-22.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células IGROV-1.
- 20 **Fig. 23-26.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células HEP-G2.
- Fig. 27-30.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células MDA-MB-231.
- Fig. 31-33.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina y gemcitabina respectivamente contra células HT-29.
- 25 **Fig. 34-37.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células RXF-393.
- Fig. 38-40.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo, gemcitabina y metotrexato respectivamente contra células U87-MG.
- 30 **Fig. 41.** Evaluación del volumen tumoral de tumores HGC-27 en ratones tratados con placebo, PM01183, 5-fluorouracilo y PM01183 más 5-fluorouracilo.
- Fig. 42.** Evaluación del volumen tumoral de tumores SW1990 en ratones tratadas con placebo, PM01183, gemcitabina y PM01183 más gemcitabina.
- Fig. 43.** Efectos de la combinación de PM01183 con metotrexato en la línea celular JURKAT.
- Fig. 44.** Efectos de la combinación de PM01183 con metotrexato en la línea celular MOLT-4.
- 35 **Fig. 45.** Efectos de la combinación de PM01183 con citarabina en la línea celular RAMOS.
- Fig. 46.** Efectos de la combinación de PM01183 con metotrexato en la línea celular RAMOS.
- Fig. 47.** Efectos de la combinación de PM01183 con metotrexato en la línea celular U-937.
- Fig. 48.** Efectos de la combinación de PM01183 con gemcitabina en la línea celular RAMOS.
- Fig. 49.** Efectos de la combinación de PM01183 con gemcitabina en la línea celular U-937.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se encontró sorprendentemente que la PM01183 potencia en gran medida la actividad anticancerosa de los antimetabolitos 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed cuando se combinan estos fármacos anticancerosos con PM01183. Por tanto, la presente invención está dirigida a proporcionar un tratamiento eficaz del cáncer basado en la combinación

45 sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed

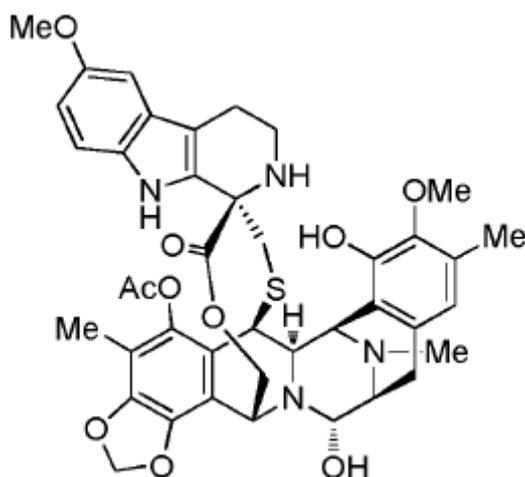
y raltitrexed.

En la presente solicitud, se entiende por "cáncer" incluir tumores, neoplasias y cualquier otra enfermedad maligna que tenga como causa tejido o células malignos.

5 El término "tratar", como se usa en la presente memoria, a menos que se indique otra cosa, significa revertir, aliviar o inhibir la progresión de la enfermedad o afección a que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria, a menos que se indique otra cosa, hace referencia al acto de tratar como "tratar" se define inmediatamente antes.

10 El término "combinación", como se usa a lo largo de la memoria descriptiva, pretende englobar la administración a un paciente que padece cáncer de los agentes terapéuticos a los que se hace referencia en las mismas o separadas formulaciones farmacéuticas, y al mismo tiempo o en diferentes momentos. Si los agentes terapéuticos se administran en diferentes momentos, deberían administrarse suficientemente cercanos en el tiempo para proporcionar que aparezca una respuesta potenciadora o sinérgica.

Como se menciona anteriormente, la PM01183 es un alcaloide sintético que tiene la siguiente estructura:



15 Se pretende que el término "PM01183" cubra aquí cualquier sal, solvato, hidrato, profármaco o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable que, tras administración al paciente, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el compuesto como se describe en la presente memoria. La preparación de sales, solvatos, hidratos y profármacos puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos en la materia.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir del compuesto original, que contiene un resto básico o ácido, mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estas composiciones con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Los ejemplos de sales de adición de base incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilenetanolamina, trietanolamina y sales de aminoácidos básicos.

30 El término "profármaco" se usa en su sentido más amplio y engloba aquellos derivados que se convierten *in vivo* en PM01183. El profármaco puede hidrolizarse, oxidarse o reaccionar de otro modo en condiciones biológicas, proporcionando PM01183. Los ejemplos de profármacos incluyen derivados y metabolitos de PM01183 que incluyen restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. Los profármacos pueden prepararse típicamente usando procedimientos bien conocidos, tales como aquellos descritos por Burger en "Medicinal Chemistry and Drug Discovery" 6ª ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y "Design and Applications of Prodrugs" (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers).

40 Además, cualquier fármaco al que se haga referencia en la presente memoria puede estar en forma amorfa o cristalina como compuesto libre o como solvatos (p.ej. hidratos), y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los procedimientos de solvatación son generalmente conocidos en la materia.

Además, puede prepararse PM01183 para uso de acuerdo con la presente invención siguiendo un proceso sintético

tal como aquel dado a conocer en el documento WO 03/014127.

Las composiciones farmacéuticas de PM01183, o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que pueden usarse incluyen soluciones, suspensiones, emulsiones, composiciones liofilizadas, etc. con excipientes adecuados para administración intravenosa. Preferiblemente, puede suministrarse PM01183 y almacenarse como un producto estéril liofilizado que comprende PM01183 y excipientes en una formulación adecuada para uso terapéutico. Para orientación adicional sobre las composiciones farmacéuticas de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, véanse por ejemplo las formulaciones descritas en el documento WO 2006/046079.

La administración de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o de composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, es preferiblemente por infusión intravenosa. Pueden usarse tiempos de infusión de hasta 72 horas, más preferiblemente de entre 1 y 24 horas, siendo más preferido de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 horas. Los tiempos de infusión cortos, que permiten llevar a cabo el tratamiento sin una noche de estancia en el hospital, son especialmente deseables. Sin embargo, la infusión puede ser de aproximadamente 24 horas o aún más si es necesario.

Preferiblemente, se efectúa la administración de PM01183 en ciclos. En un programa de administración preferido, se procura una infusión intravenosa de PM01183 a los pacientes la primera semana de cada ciclo y se dejan recuperar los pacientes durante el resto del ciclo. La duración preferida de cada ciclo es de 3 o 4 semanas. Pueden procurarse múltiples ciclos según sea necesario. La administración de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, por infusión intravenosa durante aproximadamente a 1 hora una vez cada 3 semanas es el programa de administración más preferido, aunque pueden concebirse otros protocolos como variaciones.

La presente invención se refiere a la combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed en el tratamiento del cáncer.

Los tipos de cáncer particularmente preferidos son aquellos seleccionados de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, cáncer de tiroides, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma (también conocido como cáncer hepático), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer esofágico, neuroblastoma, cáncer de cerebro, cáncer cervicouterino, cáncer anal, cáncer testicular, leucemia, mieloma múltiple y linfoma.

En una realización preferida, la invención se dirige a la combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed en el tratamiento del cáncer, y más particularmente en el tratamiento de un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, cáncer anal, leucemia y linfoma. Se prefiere particularmente la combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato en el tratamiento del cáncer, y más particularmente en el tratamiento de un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, leucemia y linfoma.

La invención incluye cualquier sal farmacéuticamente aceptable de cualquier fármaco al que se haga referencia en la presente memoria, que pueda sintetizarse a partir del compuesto original mediante procedimientos químicos convencionales como se dan a conocer en la presente memoria.

La invención se refiere a combinaciones sinérgicas que emplean PM01183, o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente. Puede obtenerse una indicación de la sinergia ensayando las combinaciones y analizando los resultados, por ejemplo mediante el procedimiento de Chou-Talalay o mediante cualquier otro procedimiento adecuado, tales como aquellos proporcionados en la sección de Ejemplos.

Los resultados clínicos favorables posibles para sinergia incluyen 1) aumentar la eficacia del efecto terapéutico, 2) disminuir la dosificación pero aumentar o mantener la misma eficacia evitando la toxicidad, 3) minimizar o retardar el desarrollo de farmacoresistencia y 4) proporcionar una sinergia selectiva contra la diana (o sinergia de eficacia), frente al hospedador (o antagonismo de toxicidad). Por consiguiente, en una combinación de dos agentes quimioterapéuticos que tienen sinergia, el régimen de tratamiento será diferente de aquellos en que la combinación de los dos fármacos muestra solo un efecto aditivo. A este respecto, si hay sinergia puede requerirse menos dosificación de uno o ambos de los agentes (en comparación con las cantidades usadas en monoterapia) para obtener la misma o incluso una mayor eficacia, y pueden reducirse o incluso evitarse los posibles efectos secundarios tóxicos. Como alternativa, si la dosificación de ambos fármacos en la combinación es la misma que cuando se procuran solos (como agentes individuales), puede esperarse un aumento de eficacia de la combinación. Por lo tanto, la existencia de sinergia en una combinación farmacológica dada modificará la duración del tratamiento y/o el régimen de tratamiento.

En otra realización, la invención se refiere a PM01183, o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el aumento o la potenciación de la eficacia terapéutica de un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con este antimetabolito. Puede obtenerse una indicación del aumento o la potenciación de la eficacia terapéutica ensayando las combinaciones y analizando los resultados, por ejemplo la inhibición del crecimiento tumoral. Esta inhibición del crecimiento tumoral puede valorarse comparando el volumen tumoral medio del tratamiento que combina los dos fármacos (PM01183 y el otro fármaco) con los del tratamiento de monoterapia del otro fármaco. A este respecto, se determina el aumento o la potenciación de la eficacia terapéutica cuando la respuesta de la terapia de combinación es mayor que la mejor respuesta del fármaco más activo administrado como un agente único (monoterapia) con el mismo programa y dosis que se usa en la terapia de combinación. Este aspecto de la invención se ilustra adicionalmente en la sección de Ejemplos, específicamente en los Ejemplos 13-14.

Se da a conocer también en la presente memoria el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer por terapia de combinación sinérgica que emplea PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, con otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

En otro aspecto, la invención se dirige a PM01183, o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed.

Según la presente invención, puede proporcionarse PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el otro fármaco anticanceroso en el mismo medicamento o como medicamentos separados para administración en el mismo momento o diferentes momentos. Preferiblemente, se proporcionan PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el otro fármaco anticanceroso como medicamentos separados para administración en diferentes momentos. Cuando se administran separadamente y en diferentes momentos, puede administrarse primero cualquiera de PM01183 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o del otro fármaco anticanceroso. Además, ambos fármacos pueden administrarse el mismo día o en días diferentes, y pueden administrarse usando el mismo programa o con programas diferentes durante el ciclo de tratamiento. Adicionalmente, puede realizarse la administración de ambos fármacos usando la misma vía de administración o vías diferentes. Por ejemplo, pueden administrarse ambos fármacos por administración intravenosa o, como alternativa, puede administrarse un fármaco por vía oral y el otro por administración intravenosa.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender todos los componentes (fármacos) en una formulación farmacéuticamente aceptable individual o, como alternativa, los componentes pueden formularse separadamente y administrarse en combinación entre sí. Pueden usarse en la presente invención diversas formulaciones farmacéuticamente aceptables bien conocidas por los especialistas en la materia. Además, puede efectuarse la selección de una formulación apropiada para uso en la presente invención por los especialistas en la materia teniendo en cuenta la vía de administración y las características de solubilidad de los componentes de la composición.

La correcta dosificación de ambos fármacos en combinación variará según la formulación particular, el modo de aplicación, y el sitio, paciente y tumor particular que se esté tratando. Se tomarán también en cuenta otros factores como edad, peso corporal, sexo, dieta, momento de administración, velocidad de excreción, afección del paciente, otras combinaciones farmacológicas, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad. La administración puede llevarse a cabo continua o periódicamente a la dosis máxima tolerada.

La combinación de la invención puede usarse sola o en combinación con uno o más de una variedad de agentes anticancerosos o agentes de cuidados paliativos.

Además, dependiendo del tipo de tumor y de la etapa de desarrollo de la enfermedad, los efectos anticancerosos de los tratamientos de la presente invención incluyen inhibición del crecimiento tumoral, retardo del crecimiento tumoral, regresión del tumor, contracción del tumor, tiempo aumentado para recrecimiento del tumor tras el abandono del tratamiento, retraso de la progresión de la enfermedad y prevención de metástasis. Se espera que, cuando se administre un tratamiento de la presente invención a un paciente, tal como un paciente humano necesitado de dicho tratamiento, dicho tratamiento produzca un efecto medido, por ejemplo, por la extensión del efecto anticanceroso, la velocidad de respuesta, el tiempo hasta progresión de la enfermedad o la tasa de supervivencia. En particular, los tratamientos de la invención son adecuados para pacientes humanos, especialmente aquellos que recidivan o son resistentes a quimioterapia previa. Se prevé también terapia de primera línea.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un kit para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende un suministro de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en unidades de dosificación durante al menos un ciclo, e instrucciones impresas para el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la

misma, con un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed en combinación sinérgica.

5 En un aspecto relacionado, la presente invención está dirigida a un kit para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende un suministro de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en unidades de dosificación durante al menos un ciclo, un suministro de un antimetabolito seleccionado de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed en unidades de dosificación durante al menos un ciclo, e instrucciones impresas para el uso de ambos fármacos en combinación sinérgica.

10 Se da a conocer también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en combinación sinérgica con otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente en el tratamiento del cáncer.

15 Se da a conocer adicionalmente en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica es preferible para uso en el tratamiento del cáncer.

Se da a conocer también en la presente memoria el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la preparación de una composición para uso en combinación sinérgica con otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente en el tratamiento del cáncer.

20 En una realización, se ponen en contacto las células cancerosas, o se tratan de otro modo, con una combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente. Las células cancerosas son preferiblemente humanas e incluyen células de carcinoma, células de sarcoma, células de leucemia, células de linfoma y células de mieloma. Más preferiblemente, las células cancerosas son células de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, cáncer de tiroides, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer esofágico, neuroblastoma, cáncer de cerebro, cáncer cervicouterino, cáncer anal, cáncer testicular, leucemia, mieloma múltiple y linfoma. Además, la combinación proporciona un efecto inhibitorio sinérgico frente a las células cancerosas, particularmente frente a las células cancerosas humanas mencionadas anteriormente.

30 Por ejemplo, la combinación inhibe la proliferación o supervivencia de las células cancerosas puestas en contacto. Un nivel menor de proliferación o supervivencia de las células cancerosas puestas en contacto en comparación con las células cancerosas no puestas en contacto apoya que la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente, es eficaz para tratar un paciente con cáncer.

35 Se da a conocer también en la presente memoria un procedimiento para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con una cantidad eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

40 Se da a conocer también en la presente memoria un procedimiento para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con una combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente, en el que dicha combinación proporciona una inhibición mejorada frente al crecimiento de células cancerosas en comparación con (i) PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en ausencia del otro fármaco anticanceroso, o (ii) el otro fármaco anticanceroso en ausencia de PM01183.

45 Se da a conocer también en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende una combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente para inhibir el crecimiento de células cancerosas, en la que dicha combinación proporciona una inhibición mejorada frente al crecimiento de células cancerosas en comparación con (i) PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en ausencia del otro fármaco anticanceroso, o (ii) el otro fármaco anticanceroso en ausencia de PM01183.

50 Se da a conocer también en la presente memoria una combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente para uso en la inhibición del crecimiento tumoral o la reducción del tamaño del tumor *in vivo*. En particular, la combinación inhibe el crecimiento *in vivo* y/o reduce el tamaño de un carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma y mieloma. Preferiblemente, la combinación inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* de tumores de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, de vejiga, próstata, páncreas, tiroides, gástrico, de ovario, hepatoma, de mama, colorrectal, de riñón, esofágico, neuroblastoma, de cerebro, cervicouterino, anal, testicular, leucemia, mieloma múltiple y linfoma.

5 Por ejemplo, estas combinaciones inhiben el crecimiento tumoral o reducen el tamaño de xenoinjertos de cáncer humano, particularmente tumores gástrico, de páncreas, sarcoma, de pulmón, colorrectal y de ovario humanos, en modelos animales. Un crecimiento reducido o tamaño reducido de los xenoinjertos de cáncer humano en modelos animales administrados con estas combinaciones apoya adicionalmente que la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente es eficaz para tratar un paciente con cáncer.

10 Por lo tanto, se da a conocer también que PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la reducción del tamaño de un tumor, comprende administrar una cantidad eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

Se da a conocer también en la presente memoria que PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la inhibición del crecimiento tumoral, comprende administrar una cantidad eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con otro fármaco anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

15 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención. Estos ejemplos no deberían interpretarse como una limitación del alcance de la invención.

20 Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas en la presente memoria no están calificadas con el término "aproximadamente". Se entiende que, se use explícitamente o no el término "aproximadamente", cualquier cantidad dada en la presente memoria pretende hacer referencia al valor dado real, y se pretende también que haga referencia a una aproximación a dicho valor dado que se deduciría razonablemente basándose en el especialista en la materia, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medida para dicho valor dado.

EJEMPLOS

25 **EJEMPLO 1.** Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma de pulmón humano.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de carcinoma pulmonar.

30 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo (5-FU) y gemcitabina (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

A549 fue la línea celular de carcinoma pulmonar humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células A549 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina a 37 °C 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

35 Se efectuó el cribado en dos partes:

40 a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco en células A549 después de 72 horas de exposición a fármaco. Brevemente, se recolectaron las células y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad de 5.000 células en 150 µl de medio de cultivo, y se incubaron durante 24 horas en medio exento de fármaco antes del tratamiento con vehículo solo o compuestos de ensayo durante 72 h.

45 Se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de reducción de MTT, en que se usó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol que se reduce a formazano púrpura en las mitocondrias de células vivas. Se añadió MTT (50 µl de solución madre 1 mg/ml) a los pocillos y se incubó durante 8 horas a 37 °C hasta que se formaron cristales de formazano. Después de retirar suavemente el medio de cultivo, se añadió DMSO para disolver el producto de formazano púrpura insoluble en una solución coloreada. Se cuantificó la absorbancia de los pocillos midiendo la densidad óptica a 540 nm. Se expresaron los resultados como porcentaje del crecimiento de células de control. Se calcularon los valores de CI₅₀ (concentración de fármaco que produce un 50 % de inhibición del crecimiento celular) para los estudios de combinación usando el software Prism v5.02 (GraphPad). Se expresaron los resultados como concentración molar y se representaron como la media de 2-4 ensayos independientes. Se muestran en la tabla 1 los valores de CI₅₀ (exposición a fármaco de 72 horas) de cada agente individual para la línea celular tumoral A549.

Tabla 1: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	3,60 x 10 ⁻⁹
Gemcitabina	2,80 x 10 ⁻¹⁰
5-FU	9,23 x 10 ⁻⁵

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas A549 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente. Se usaron los valores de CI₅₀ anteriormente obtenidos como concentraciones de partida para cada compuesto (100 % de concentración). Se efectuaron diluciones arbitrarias como porcentaje del valor de CI₅₀ inicial (100, 75, 70, 60, 50, 40, 30, 25 y 0 %) para cada par de compuestos y se ensayaron en curvas de dosis y respuesta complementarias combinadas (concentraciones opuestas) como sigue:

	CI ₅₀ de PM01183	CI ₅₀ de agente
10	100 %	0 %
	75 %	25 %
	70 %	30 %
	60 %	40 %
	50 %	50 %
15	40 %	60 %
	30 %	70 %
	25 %	75 %
	0 %	100 %

Como ayuda visual, se representaron los valores de respuesta en una gráfica de dispersión con las relaciones de dosis dadas en el eje x y el % de valores de respuesta en el eje y. Se trazó una línea horizontal entre los dos valores de respuesta de criterio de valoración (p.ej., entre los valores de respuesta de 100 % de CI₅₀ de PM01183 y 100 % de CI₅₀ de agente terapéutico estándar). En casos en que los valores de respuesta en los dos puntos de criterio de valoración fueran aproximadamente equivalentes, los puntos por encima o por debajo de esta línea predicha de aditividad podían interpretarse como representantes de una interacción farmacológica antagonista o sinérgica, respectivamente.

Las combinaciones *in vitro* de cada fármaco con PM01183 tienen el potencial de ser sinérgicas, aditivas o antagonistas. La citotoxicidad sinérgica para células tumorales es un efecto óptimo e implica que la combinación de PM01183 con otro fármaco es más eficaz que cualquier fármaco solo.

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma pulmonar humano A549, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 1) y de PM01183 con gemcitabina (Figura 2) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

EJEMPLO 2. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de sarcoma humanas.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de sarcoma.

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: gemcitabina y citarabina (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4X. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

A673 fue la línea celular de rhabdomyosarcoma humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células A673 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 MM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina a 37 °C, 50 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición al fármaco en la línea celular tumoral A673.

5 Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral A673 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,20 \times 10^{-9}$
Citarabina	$1,97 \times 10^{-7}$
Gemcitabina	$4,34 \times 10^{-10}$

10 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron las células tumorales humanas A673 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones de CI_{50} únicas que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y el sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

15 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de sarcoma humano A673, la combinación de PM01183 con citarabina exhibía una fuerte sinergia (Figura 3), mientras que la combinación de PM01183 con gemcitabina mostraba sinergia (Figura 4) a relaciones de dosis 75/25-70/30.

EJEMPLO 3. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de melanoma maligno.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de melanoma maligno.

20 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero para conseguir una concentración final 4X. Se añadieron alícuotas de 50 μl de cada compuesto diluido por pocillo.

25 SK-MEL-2 fue la línea celular de melanoma humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células SK-MEL-2 en medio esencial mínimo de Eagle suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 y 95 % humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral SK-MEL-2.

30 Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral SK-10-2 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se mostraron en la tabla 3.

Tabla 3: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,00 \times 10^{-9}$
Citarabina	$3,89 \times 10^{-6}$
Metotrexato	$1,00 \times 10^{-4}$
5-FU	$7,00 \times 10^{-4}$

35 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales SK-MEL-2 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente a la misma combinación de concentraciones

de CI_{50} únicas que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe a continuación y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

5 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de melanoma humano SK-MEL-2, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 5), de PM01183 con citarabina (Figura 6) y de PM01183 con metotrexato (Figura 7) exhibía una fuerte sinergia.

EJEMPLO 4. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre las líneas celulares de carcinoma de próstata humana.

10 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de cáncer de próstata.

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4X. Se diluyeron alícuotas de 50 μl de cada compuesto diluido por pocillo.

15 PC-3 fue la línea celular de adenocarcinoma de próstata humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células PC-3 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1

20 a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral PC-3.

Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral PC-3 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,60 \times 10^{-9}$
5-FU	$1,00 \times 10^{-3}$
Metotrexato	$1,20 \times 10^{-4}$
Citarabina	$4,00 \times 10^{-5}$
Gemcitabina	$4,00 \times 10^{-7}$

25 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron las células tumorales humanas PC-3 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones de CI_{50} únicas que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

30 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 8) y de PM01183 con citarabina (Figura 9) exhibía sinergia a casi todas las relaciones de dosis, y la combinación de PM01183 con gemcitabina exhibía una fuerte sinergia (Figura 10). Finalmente, la combinación de PM01183 con metotrexato mostraba sinergia (Figura 11) a las relaciones de dosis 30/70-25/75.

35 **EJEMPLO 5.** Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma de páncreas humano.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de carcinoma pancreático.

40 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: gemcitabina, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4X. Se

añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

PANC-1 fue la línea celular de carcinoma pancreático humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células PANC-1 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementando con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

5 Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral PANC-1.

Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral PANC-1 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la Tabla 5.

10 Tabla 5: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	2,80 x 10 ⁻⁹
Citarabina	9,00 x 10 ⁻⁵
Gemcitabina	1,00 x 10 ⁻⁶
Metotrexato	1,00 x 10 ⁻⁵

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron las células tumorales humanas PANC-1 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones de CI₅₀ únicas que las descritas en el ejemplo 1.

15 Se efectuaron el cultivo celular y el sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

20 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma de páncreas humano PANC-1, la combinación de PM01183 con citarabina (Figura 12) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis, mientras que la combinación de PM01183 con gemcitabina (Figura 13) y de PM01183 con metotrexato (Figura 14) exhibía una fuerte sinergia.

EJEMPLO 6. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma gástrico humano.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de cáncer gástrico.

25 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

30 HGC-27 fue la línea celular de carcinoma gástrico seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células HGC-27 en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IDMD) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a at 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral HGC-27.

35 Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral HGC27 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$8,50 \times 10^{-10}$
5-FU	$1,00 \times 10^{-5}$
Metotrexato	$3,30 \times 10^{-8}$
Citarabina	$5,00 \times 10^{-5}$
Gemcitabina	$5,34 \times 10^{-10}$

5 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas HGC-27 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones de CI_{50} únicas que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y el sembrado celular como se describe anteriormente, y se midió el efecto citotóxico por el ensayo MTT, como se da a conocer en el ejemplo 1.

10 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma gástrico humano HGC-27, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 15) y de PM01183 con citarabina (Figura 16) exhibía sinergia, que era incluso fuerte a algunas relaciones de dosis. La combinación de PM01183 con gemcitabina (Figura 17) y de PM01183 con metotrexato (Figura 18) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

EJEMPLO 7. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma ovárico humano.

15 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de cáncer de ovario.

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 μl de cada compuesto diluido por pocillo.

20 IGROV-1 fue la línea celular de adenocarcinoma ovárico humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células IGROV-1 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

25 a. En un primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral IGROV-1.

Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral IGROV-1 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$3,20 \times 10^{-9}$
5-FU	$9,00 \times 10^{-5}$
Metotrexato	$1,00 \times 10^{-4}$
Citarabina	$1,17 \times 10^{-5}$
Gemcitabina	$6,34 \times 10^{-9}$

30 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas IGROV-1 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones

de CI_{50} únicas a las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y siembra celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT dado a conocer en el ejemplo 1.

- 5 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma ovárico humano IGROV-1, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 19) y de PM01183 con citarabina (Figura 20) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis. La combinación de PM01183 con gemcitabina (Figura 21) y de PM01183 con metotrexato (Figura 22) exhibía sinergia.

EJEMPLO 8. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano.

- 10 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de cáncer hepatocelular.

- 15 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 μl de cada compuesto diluido por pocillo.

HepG2 fue la línea celular de carcinoma hepático hepatocelular humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células HepG2 en medio de Eagle esencial mínimo (MEME) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad.

- 20 Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral HepG2.

Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral HepG2 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 8.

- 25 **Tabla 8:** valores de CI_{50} en concentración molar (M) para cada agente

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,50 \times 10^{-9}$
5-FU	$4,50 \times 10^{-6}$
Metotrexato	$3,96 \times 10^{-8}$
Citarabina	$2,06 \times 10^{-5}$
Gemcitabina	$5,34 \times 10^{-9}$

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas HepG2 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI_{50} que las descritas en el ejemplo 1.

- 30 Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT dado a conocer en el ejemplo 1.

- 35 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular hepatocelular humana HepG2, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 23) mostraba sinergia a las relaciones de dosis 75/25, 50/50 y 30/70. La combinación de PM01183 con citarabina (Figura 24), de PM01183 con gemcitabina (Figura 25) y de PM01183 con metotrexato (Figura 26) exhibía una fuerte sinergia.

EJEMPLO 9. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma de mama humano.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de cáncer de mama.

- 40 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se

prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

5 MDA-MB-231 fue la línea celular de adenocarcinoma de mama humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células MDA-MB-231 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral MDA-MB-231.

10 Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral MDAMB-231 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) para cada agente

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	3,50 x 10 ⁻⁹
5-FU	9,00 x 10 ⁻⁵
Metotrexato	5,94 x 10 ⁻⁶
Citarabina	9,57 x 10 ⁻⁶
Gemcitabina	8,50 x 10 ⁻⁹

15 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas MDA-MB-231 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI₅₀ que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

20 Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma de mama humano MDA-MB-231, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 27) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis. La combinación de PM01183 con citarabina (Figura 28) y de PM01183 con gemcitabina (Figura 29) exhibía una fuerte sinergia, mientras que la combinación de PM01183 con metotrexato (Figura 30) mostraba sinergia a las relaciones de dosis 75/25-70/30 y 50/50.

25 **EJEMPLO 10.** Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma colorrectal humano.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de cáncer colorrectal.

30 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina y citarabina (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

HT-29 fue la línea celular de adenocarcinoma de mama humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células HT-29 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

35 Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral HT29.

Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral HT-29 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 10.

40 Tabla 10: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) para cada agente

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	3,70 x 10 ⁻⁹
5-FU	9,00 x 10 ⁻⁶
Citarabina	7,80 x 10 ⁻⁶
Gemcitabina	4,00 x 10 ⁻⁷

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas Ht-29 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente en la misma combinación de concentraciones únicas de CI₅₀ que las descritas en el ejemplo 1.

- 5 Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma colorrectal humano HT-29, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 31) y de PM01183 con gemcitabina (Figura 33) mostrabasineria a casi todas las relaciones de dosis, y la combinación de PM01183 con citarabina (Figura 32) exhibía una fuerte sinergia.

- 10 **EJEMPLO 11.** Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de carcinoma de riñón humano.

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de cáncer de riñón.

- 15 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina, metotrexato y citarabina (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

- 20 RXF-393 fue la línea celular de carcinoma de riñón humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células RXF-393 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 27 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

a. En un primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral RXF-393.

- 25 Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral RXF-393 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	5,00 x 10 ⁻⁹
Citarabina	5,00 x 10 ⁻⁵
Gemcitabina	5,00 x 10 ⁻⁷
5-FU	3,00 x 10 ⁻⁴
Metotrexato	1,75 x 10 ⁻⁴

- 30 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas RXF-393 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI₅₀ que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma de riñón humano RXF-393, la combinación de

PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 34) y de PM01183 con citarabina (Figura 35), de PM01183 con gemcitabina (Figura 36) y de PM01183 con metotrexato (Figura 37) mostraban sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

EJEMPLO 12. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de glioblastoma humano.

- 5 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de glioblastoma.

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: 5-fluorouracilo, gemcitabina y metotrexato (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

U87-MG fue la línea celular de glioblastoma humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células U87-MG en medio de Eagle esencial mínimo (MEME) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 27 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes como se da a conocer en el ejemplo 1:

- 15 a. En un primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral U87-MG.

Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral U87-MG usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	4,50 x 10 ⁻⁹
5-FU	1,00 x 10 ⁻³
Gemcitabina	4,50 x 10 ⁻⁷
Metotrexato	5,00 x 10 ⁻⁵

- 20 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas U87-MG con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI₅₀ que las descritas en el ejemplo 1.

Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico mediante el ensayo de MTT como se da a conocer en el ejemplo 1.

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de glioblastoma humano U87-MG, la combinación de PM01183 con 5-fluorouracilo (Figura 38) y de PM01183 con metotrexato (Figura 40) exhibían sinergia. La combinación de PM01183 con gemcitabina (Figura 39) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

- 30 **EJEMPLO 13.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con 5-fluorouracilo en xenoinjertos de tumores gástricos humanos.

El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de 5-fluorouracilo usando un modelo de xenoinjerto de carcinoma gástrico humano.

Se utilizaron para todos los experimentos ratones lampiños atímicos hembras (Harlan Laboratories Models, S.L. (Barcelona, España). Se albergaron individualmente los animales en jaulas ventiladas individualmente, hasta 10 por jaula en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a 21-23 °C y 40-60 % de humedad. Se dejó libre acceso a los ratones a dieta de roedor estándar irradiada y agua esterilizada. Se aclimataron los animales durante al menos 5 días antes de la implantación de tumor con una suspensión celular tumoral.

El modelo tumoral usado en estos estudios fue la línea celular HGC-27, que se obtuvo de la European Collection of Cell Cultures (ECACC nº 94042256).

- 40 Se hicieron crecer las células HGC-27 a 37 °C con 5 % de CO₂ en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IDMD). Se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de cada animal, usando una aguja 26G y una jeringuilla de 1 cm³, 5x10⁶ células HGC-27 (del paso *in vitro* 4 del estudio de PM01183 y cisplatino y del pase 6 del estudio de PM01183 y 5-fluorouracilo), en 0,05 ml de suspensión de 50 % de Matrigel y 50 % de medio exento de suero, sin

antibióticos.

Se determinaron las medidas tumorales usando un calibre digital (Fowler Sylvac, S235PAT). Se usó la fórmula para calcular el volumen de un elipsoide prolato para estimar el volumen tumoral (mm^3) a partir de medidas tumorales bidimensionales: $\text{volumen tumoral} (\text{mm}^3) = [L \times W^2] + 2$, en que L es la longitud y el diámetro mayor en mm, y W es la anchura y el diámetro menor en mm de un tumor. Suponiendo una densidad unitaria, se convirtió el volumen en peso (concretamente, $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$). Se midieron 2-3 veces por semana el volumen tumoral y los pesos corporales animales partiendo del primer día de tratamiento (día 0).

Se valoró la tolerabilidad del tratamiento monitorizando la evolución del peso corporal, los signos clínicos así como las evidencias de daño local en el sitio de inyección.

Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente $165,5 \text{ mm}^3$ en el estudio de PM01183 con xisplatino y un volumen de aproximadamente 170 mm^3 en el estudio de PM01183 con 5-fluorouracilo, se asignaron aleatoriamente los ratones a grupos de tratamientos y de control (N= 5-7/grupo) basándose en las medidas de peso corporal y volumen tumoral usando el software Newlab Oncology (versión 2.25.06.00).

Se proporcionó PM01183 en forma de viales de torta liofilizada de PM01183 que se ha reconstituido con agua para infusión a una concentración de 0,2 mg/ml. Se diluyó adicionalmente la solución madre de PM01183 en solución de glucosa al 5 % para inyecciones a las concentraciones de formulación de sosificación. Se proporcionó el 5-fluorouracilo como una solución preparada diluyendo el producto con solución salina al 0,9 % para inyecciones hasta la concentración diana final.

En estos experimentos, se administraron por vía intravenosa tratamiento de PM01183 y 5-fluorouracilo, así como placebo, una vez por semana durante 2 semanas consecutivas el día 0 y 7. Se administraron los grupos de nivel de dosis como agentes individuales o en combinación.

Se usó la comparación del volumen tumoral mediano en los grupos de tratamiento (T) con el volumen tumoral mediano en el grupo de control (T/C x 100 %) para la evaluación de la eficacia antitumoral.

Además, se determinó la potenciación cuando la respuesta del grupo de combinación era mayor que la mejor respuesta del agente más activo administrado como un único agente (monoterapia) con el mismo programa y dosis que los usados en la terapia de combinación.

Finalmente, se obtuvo el índice de combinación (IC), que mide cuantitativamente el grado de interacciones farmacológicas, a partir de las fracciones afectadas por el tratamiento, Fa (definido como $1 - T/C$) para cada grupo experimental el último día de medida usando el principio del efecto mediano (Chou T.C. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58, 621-681).

La Tabla 13 reseña los valores de % de T/C obtenidos con PM01183 y 5-fluorouracilo administrados ambos como agentes individuales y en combinación para cada nivel de dosis, y la Figura 41 muestra la evaluación del volumen tumoral de tumores HGC-27 en ratones tratados con placebo, PM01183, 5-fluorouracilo y las correspondientes combinaciones para los grupos dosificados a las dos proporciones mayores.

Tabla 13

Grupo	Dosis	Materiales de ensayo	% de T/C al día						
			0	2	5	7	9	12	14
G01 (grupo de control)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	99,6	78,6	50,9	43,3	41,0	33,0	29,2
G03	0,135 mg/kg	PM01183	100,2	81,5	58,7	61,4	60,2	54,6	55,1
G04	0,09 mg/kg	PM01183	100,6	90,5	87,6	83,4	82,6	76,7	67,7
G05	0,045 mg/kg	PM01183	99,9	84,3	103,2	104,6	103,5	101,6	85,0
G06	50,0 mg/kg	5-fluorouracilo	100,3	81,2	82,3	81,1	75,6	69,6	60,7
G07	37,5 mg/kg	5-fluorouracilo	99,4	86,9	86,9	78,6	73,2	76,7	83,1

Grupo	Dosis	Materiales de ensayo	% de T/C al día						
			0	2	5	7	9	12	14
G08	25,0 mg/kg	5-fluorouracilo	100,6	89,8	97,0	111,4	102,6	93,9	82,8
G09	12,5 mg/kg	5-fluorouracilo	100,7	81,7	101,3	102,8	98,6	90,5	83,8
G10	0,18 mg/kg	PM01183	99,6	73,0	44,2	35,9	31,5	25,3	22,0
	50 mg/kg	5-fluorouracilo							
G11	0,135 mg/kg	PM01183	100,8	73,4	63,5	53,1	50,6	42,8	51,1
	37,5 mg/kg	5-fluorouracilo							
G12	0,09 mg/kg	PM01183	99,6	95,8	97,7	98,9	90,0	74,7	69,9
	25 mg/kg	5-fluorouracilo							
G13	0,045 mg/kg	PM01183	99,5	80,6	87,3	88,5	99,3	87,1	84,2
	12,5 mg/kg	5-fluorouracilo							

Placebo: torta liofilizada que contiene 100 mg de sacarosa + 6,8 mg de dihidrogenofosfato de potasio + ácido fosfórico c.s. a pH 3,8-4,5, que se reconstituyó con 1 ml de agua para infusión.

5 Según estos ensayos, se encontró que el tratamiento de combinación de PM01183 y 5-fluorouracilo era eficaz en la inhibición del crecimiento de células gástricas HGC-27, dando como resultado una reducción tumoral estadísticamente significativa ($P < 0,01$) en comparación con el grupo de control, con valores de T/C de 22,0 y 51,1 % (día 14) en los dos grupos de alta dosis. Además, la combinación de PM01183 y 5-fluorouracilo producía valores de T/C menores que el agente individual más activo en este experimento (PM01183 a una dosis de 0,18 mg/kg). Específicamente, los valores de TC (%) de la combinación (5-fluorouracilo 50 mg/kg + PM01183 0,18 mg/kg) frente a PM01183 sola (PM01183 0,18 mg/kg) eran de 35,9 frente a 43,3 (día 7), de 31,5 frente a 41,0 (día 9), de 25,3 frente a 33,0 (día 12) y de 22,0 frente a 29,2 (día 14). Por lo tanto, cuando se combina PM01183 con 5-fluorouracilo, se observa claramente una potenciación de la actividad antitumoral.

Adicionalmente, basándose en el principio del efecto mediano, la combinación de PM01183 y 5-fluorouracilo daba como resultado valores de IC de 0,78 (a una F_a igual a 0,97), indicando una sinergia moderada en ratones portadores de tumores xenoinjertados HGC-27 gástricos.

15 **EJEMPLO 14.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con gemcitabina en xenoinjertos de tumores pancreáticos humanos

El objeto de estos estudios era evaluar la capacidad de PM01183 de potenciar la actividad antitumoral de la gemcitabina usando un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano.

20 Se utilizaron para todos los experimentos ratones lampiños atómicos hembra (Harlan laboratories Models, S.L. (Barcelona, España). Se albergaron los animales en jaulas individualmente ventiladas, hasta 10 por jaula en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a 21-23 °C y 40-60 % de humedad. Se dejó a los ratones libres acceso a dieta de roedor estándar irradiada y agua esterilizada. Se aclimataron los animales durante al menos 5 días antes de la implantación tumoral con una suspensión celular tumoral.

25 El modelo tumoral usado en estos estudios fue la línea celular SW1990, que se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC: CRI-2172™).

Se hicieron crecer células SW1990 a 37 °C con 5 % de CO₂ en medio RPMI-1640. Se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de cada animal, usando una aguja 26G y una jeringuilla de 1 cm³, 5x10⁶ células SW1990, del paso *in vitro* 12, en 0,05 ml de suspensión de 50 % de Matrigel y 50 % de medio exento de suero, sin antibióticos.

30 Se efectuaron las medidas tumorales y se determinó la tolerabilidad al tratamiento como se da a conocer en el Ejemplo 13.

Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 210 mm³, se asignaron aleatoriamente los ratones a los grupos de tratamiento y control (N= 5-7/grupo) basándose en las medidas de peso corporal y volumen tumoral

usando el software Newlab Oncology (versión 2.25.06.00).

5 Se proporcionó PM01183 en forma de viales de torta liofilizada de PM01183 que se reconstituyó con agua para infusión hasta una concentración de 0,2 mg/ml. Se diluyó adicionalmente la solución madre de PM01183 en solución de glucosa al 5 % para inyección hasta las concentraciones de formulación de dosificación. Se proporcionó gemcitabina como una solución preparada reconstituyendo el producto con solución salina al 0,9 % para inyección a una concentración de solución madre de 40 mg/ml. Se diluyó adicionalmente la solución madre de gemcitabina con solución salina al 0,9 % para inyección hasta la concentración final diana.

10 En estos experimentos, se administraron los tratamientos de PM01183 y gemcitabina, así como placebo, por vía intravenosa una vez por semana hasta 3 semanas consecutivas los días 0, 7 y 14. Los grupos de nivel de dosis se administraron como agentes individuales o en combinación.

Se usó para la evaluación de la eficacia antitumoral la comparación del volumen tumoral mediano en los grupos de tratamiento (T) con el volumen tumoral mediano en el grupo de control (TIC x 100 %). Además, se determinaron la potenciación e índice de combinación como se da a conocer en el Ejemplo 13.

15 La Tabla 14 reseña los valores de % de T/C obtenidos con PM01183 y gemcitabina administrados ambos como agentes individuales y en combinación para cada nivel de dosis, y la Figura 42 muestra la evaluación del volumen tumoral de tumores SW1990 en ratones tratados con placebo, PM01183, gemcitabina y las correspondientes combinaciones de los grupos dosificados a las dos relaciones mayores.

Tabla 14:

			% T/C al día					
Grupo	Dosis	Materiales de ensayo	0	3	6	8	10	13
G01 (grupo de control)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01883	100,0	74,3	61,3	59,4	56,7	56,1
G03	0,135 mg/kg	PM01883	99,6	81,3	71,0	73,1	65,6	63,1
G04	0,09 mg/kg	PM01883	101,1	81,5	72,8	68,7	68,4	74,4
G05	0,045 mg/kg	PM01883	100,2	83,6	82,8	93,3	82,9	88,1
G06	180 mg/kg	Gemcitabina	102,2	84,1	73,9	66,1	60,9	59,4
G07	135,0 mg/kg	Gemcitabina	102,3	78,3	71,9	63,7	55,4	52,7
G08	90,0 mg/kg	Gemcitabina	103,8	70,0	73,8	63,3	55,6	54,8
G09	45,0 mg/kg	Gemcitabina	102,3	85,5	70,3	70,5	63,3	64,8
G10	0,18 mg/kg 180 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	102,1	69,7	51,2	46,2	36,0	34,1
G11	0,135 mg/kg 135,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	100,4	64,6	52,8	51,5	48,9	46,0
G12	0,09 mg/kg 90,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	98,2	83,2	64,4	59,7	50,6	49,6
G13	0,045 mg/kg 45,0 mg/kg	PM01183 Gemcitabina	97,7	81,6	70,9	68,8	65,9	65,7

Placebo: como se da a conocer en la tabla 13.

Tabla 14 (Cont.)

Grupo	Dosis	Materiales de ensayo	% T/C al día					
			15	17	20	22	24	28
G01 (grupo de control)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01883	53,2	47,8	44,2	45,3	44,8	38,9
G03	0,135 mg/kg	PM01883	56,3	56,7	56,9	56,5	53,0	51,7
G04	0,09 mg/kg	PM01883	74,7	80,7	71,9	75,4	77,3	63,9
G05	0,045 mg/kg	PM01883	92,6	86,5	85,1	84,5	85,8	85,4
G06	180 mg/kg	Gemcitabina	58,5	52,1	49,1	48,6	46,9	39,3
G07	135,0 mg/kg	Gemcitabina	54,8	51,2	49,5	48,7	49,8	49,5
G08	90,0 mg/kg	Gemcitabina	49,9	47,4	47,6	47,0	45,9	49,2
G09	45,0 mg/kg	Gemcitabina	63,1	58,5	58,7	57,3	65,2	59,3
G10	0,18 mg/kg	PM01183	34,7	31,6	31,7	28,0	26,0	22,7
	180,0 mg/kg	Gemcitabina						
G11	0,135 mg/kg	PM01183	42,4	38,2	36,6	34,6	31,5	25,8
	135,0 mg/kg	Gemcitabina						
G12	0,09 mg/kg	PM01183	47,4	46,0	43,8	49,1	46,0	42,9
	90,0 mg/kg	Gemcitabina						
G13	0,045 mg/kg	PM01183	57,9	59,9	55,9	54,9	52,1	50,5
	45,0 mg/kg	Gemcitabina						

Placebo: como se da a conocer en la tabla 13.

Según este ensayo, se encontró que:

- 5 a. El tratamiento de combinación de PM01183 y gemcitabina era eficaz en la inhibición del crecimiento de células pancreáticas SW 1990, dando como resultado una reducción tumoral estadísticamente significativa ($P < 0,01$) en comparación con el grupo de control con valores de T/C de 22,7 y 25,8 % (día 28) en los dos grupos de alta dosis. Además, la combinación de PM01183 y gemcitabina producía menores valores de T/C que el agente individual más activo en este experimento (PM01183 a una dosis de 0,18 mg/kg). Específicamente, los valores de TC (%) de la combinación (gemcitabina 180 mg/kg + PM01183 0,18 mg/kg) frente a PM01183 sola (PM01183 0,18 mg/kg) fueron de 31,7 frente a 44,2 (día 20), de 28,0 frente a 45,3 (día 22), de 26,0 frente a 44,8 (día 24) y de 22,7 frente a 38,9 (día 28). Por lo tanto, cuando se combina PM01183 con gemcitabina, se observa claramente una potenciación de la actividad antitumoral.

15 Adicionalmente, basándose en el principio del efecto mediano, la combinación de PM01183 y gemcitabina daba como resultado valores de CI menores de 1 (a F_a mayor de 0,8), indicando sinergia en ratones portadores de tumores xeinoinjertados SW1990 pancreáticos.

EJEMPLO 15. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con metotrexato sobre líneas celulares de leucemia humana

20 Se evaluó el siguiente agente en combinación con PM01183: metotrexato (solución madre de este compuesto preparada en DMSO puro y almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 μl del compuesto diluido por pocillo.

JURKAT y MOLT-4 fueron las líneas celulares de leucemia humana seleccionadas para este ensayo, que se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Se hicieron crecer células JURKAT y MOLT-4 en medio RPMI exento de rojo fenol suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100

unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinó la potencia relativa de cada compuesto frente a las diferentes líneas celulares usando un ensayo de citotoxicidad por exposición *in vitro* de 72 horas.

- 5 Brevemente, se sembraron las células en placas de microvaloración de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo en 150 µl de medio de cultivo y se incubaron durante 4-6 horas en medio exento de fármaco antes del tratamiento con vehículo solo o compuestos de ensayo durante 72 horas.

Después de la incubación, se evaluó el efecto citotóxico usando un ensayo de reducción de MTT. Se añadieron 50 µl de solución de MTT (1 mg/ml) a los pocillos y se incubaron durante 15-17 horas a 37 °C, hasta que se formaron cristales de formazano. Después de retirar suavemente el medio de cultivo, se añadió DMSO para disolver el producto de formazano púrpura insoluble en una solución coloreada. Se cuantificó la absorbancia de los pocillos midiendo la densidad óptica a 540 nm. Se expresaron los resultados como el porcentaje del crecimiento de las células de control. Se calcularon los valores de CE₅₀ (concentración eficaz semimáxima) usados para los estudios de combinación usando el software Prism v5.02 (GraphPad). Se expresó la CE₅₀ como concentración molar y representaba la media de al menos tres ensayos independientes.

Se muestran en las tablas 15 y 16 los valores de CE₅₀ individuales obtenidos para cada fármaco.

Tabla 15: Valores de CE₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes para la línea celular tumoral JURKAT

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Metotrexato	1,45 x 10 ⁻⁷
PM01183	1,55 x 10 ⁻⁹

20 Tabla 16: Valores de CE₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes para la línea celular tumoral MoLT-4

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Metotrexato	4,39 x 10 ⁻⁸
PM01183	8,57 x 10 ⁻¹⁰

- b. En un segundo conjunto de experimentos, se efectuaron las curvas de concentración y respuesta para los agentes ensayados, tanto solos como en combinación de dos fármacos, usando la misma metodología descrita en el párrafo anterior.

Dadas las diferencias significativas entre los valores de CE₅₀ respectivos para PM01183 y los demás fármacos estándares en este estudio, se usaron diferentes relaciones de concentraciones fijas para los dos fármacos. Normalmente, la selección de las relaciones fijas de concentraciones fueron la relación equipotente (1:1) al valor de CE₅₀ para cada fármaco y algunas otras relaciones que representan diferentes porcentajes de los correspondientes valores de CE₅₀ para cada fármaco por encima o por debajo. Usando estas concentraciones de partida, se efectuaron diluciones en serie constantes para generar las curvas de concentración y respuesta para cada conjunto de fármacos, solos o en combinación.

Se evaluó el efecto de la combinación de dos fármacos, en comparación con el efecto de cada fármaco solo, sobre la viabilidad de células tumorales usando el procedimiento de Chou y Talalay, que está basado en el principio del efecto mediano (Chou y Talalay, Adv. Enzyme Regul. 1984, 22, 27-55). La ecuación del efecto mediano: $f_a/f_u = (C / C_m)^m$ (en que C es la concentración de fármaco, C_m la concentración de efecto mediano (concretamente CI₅₀, DE₅₀ o DL₅₀, que inhibe el sistema en estudio un 50 %), f_a la fracción celular afectada por la concentración de fármaco C, f_u la fracción no afectada y m el coeficiente de sigmoicidad de la curva de concentración y respuesta), describe la relación entre la concentración y el efecto de un fármaco sobre un sistema biológico dado.

- 40 Basándose en esta ecuación, se usa el término "índice de combinación (IC)" como una medida cuantitativa del grado de interacciones farmacológicas. El índice de combinación (IC) se determina mediante la ecuación:

$$IC = (C)_1(C_x)_1 + (C)_2/(C_x)_2$$

en que $(C_x)_1$ es la concentración de fármaco 1 solo que inhibe un porcentaje x de un sistema, $(C_x)_2$ es la concentración de fármaco 2 solo que inhibe el mismo porcentaje x del sistema y $(C)_1 + (C)_2$ las concentraciones de fármaco 1 y fármaco 2 que en combinación inhiben también un porcentaje x del sistema. Se calcularon los valores de IC resolviendo la ecuación para diferentes valores de f_a (concretamente, para diferentes grados de inhibición del crecimiento celular). Los valores de IC <1 indican sinergia, el valor de 1 indica efectos aditivos y valores >1 indican antagonismo.

Se analizaron los datos usando el software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, RU). Para análisis estadístico y gráficos, se usó el software Prism (GraphPad, San Diego, EE.UU.). Todos los resultados representan la media de al menos tres experimentos independientes.

Se muestran en las Figuras 43-44 el efecto de las combinaciones farmacológicas ensayadas sobre la proliferación celular:

- Combinación de PM01183 con metotrexato. La combinación de PM01183 con metotrexato en la línea celular JURKAT (Figura 43) daba como resultado ciertos efectos sinérgicos (IC<1) a determinadas concentraciones de ambos fármacos. Los efectos de PM01183 en combinación con metotrexato en la línea celular MOLT-4 (Figura 44) eran mayoritariamente aditivos.

EJEMPLO 16. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de linfoma humano.

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: gemcitabina, citarabina y metotrexato, (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y almacenadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

RAMOS y U-937 fueron las líneas celulares de linfoma humano seleccionadas para este ensayo, que se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Se hicieron crecer células RAMOS y U-937 en medio RPMI exento de rojo fenol suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

Se efectuó el cribado en dos partes, como se describe anteriormente en el ejemplo 15.

En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CE₅₀ individuales para cada fármaco como se muestra en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Valores de CE₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes para la línea celular tumoral RAMOS.

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Gemcitabina	2,51 x 10 ⁻⁸
Citarabina	3,64 x 10 ⁻⁸
Metotrexato	5,02 x 10 ⁻⁶
PM01183	1,39 x 10 ⁻⁹

Tabla 18. Valores de CE₅₀ en concentración molar (M) para cada uno de los agentes para la línea celular tumoral U-937.

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Gemcitabina	3,27 x 10 ⁻⁸
Metotrexato	2,63 x 10 ⁻⁸
PM01183	1,03 x 10 ⁻⁹

En un segundo conjunto de ensayos, se efectuaron las curvas de concentración y respuesta para los agentes ensayados, tanto solos como en combinación de dos fármacos. Se evaluaron los efectos de las combinaciones farmacológicas usando el procedimiento de Chou y Talalay como se describe en el ejemplo 15.

Se muestra en las Figuras 45-49 el efecto de las combinaciones farmacológicas ensayadas sobre la proliferación celular:

- Combinación de PM01183 con citarabina. La combinación de PM01183 con citarabina en la línea celular RAMOS (Figura 45) daba como resultado ciertos efectos sinérgicos ($IC < 1$).
- 5 - Combinación de PM01183 con metotrexato. La combinación de PM01183 con metotrexato en la línea celular RAMOS (Figura 46) daba como resultado ciertos efectos sinérgicos ($IC < 1$) a determinadas concentraciones de ambos fármacos. Los efectos de PM01183 en combinación con metotrexato en la línea celular U-937 (Figura 47) daba como resultado ciertos efectos sinérgicos a determinadas concentraciones.
- 10 - Combinación de PM01183 con gemcitabina. La combinación de PM01183 con gemcitabina en la línea celular RAMOS (Figura 48) era aditiva o sinérgica ($IC < 1$) a determinadas concentraciones de ambos fármacos. La combinación de PM01183 con gemcitabina en la línea celular U-937 (Figura 49) daba como resultado efectos sinérgicos ($IC < 1$).

REIVINDICACIONES

- 5 1. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antimetabolito, en la que el antimetabolito se selecciona de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed.
- 10 2. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el aumento de la eficacia terapéutica de un antimetabolito en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación sinérgica con dicho antimetabolito, en la que el antimetabolito se selecciona de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed.
- 15 3. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el antimetabolito, forman parte del mismo medicamento.
- 20 4. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que se proporcionan PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el antimetabolito como medicamentos separados para administración en el mismo momento o en momentos diferentes.
5. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según la reivindicación 4, en la que se proporcionan PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y el antimetabolito como medicamentos separados para administración en momentos diferentes.
- 25 6. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el antimetabolito se selecciona de 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, citarabina y metotrexato.
- 30 7. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según la reivindicación 6, en la que el antimetabolito se selecciona de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina y metotrexato.
8. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el cáncer para tratar se selecciona de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, cáncer de tiroides, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer esofágico, neuroblastoma, cáncer de cerebro, cáncer cervicouterino, cáncer anal, cáncer testicular, leucemia, mieloma múltiple y linfoma.
- 35 9. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso según la reivindicación 8, en la que el cáncer para tratar se selecciona de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, leucemia y linfoma.
- 40 10. Un kit para uso en el tratamiento del cáncer que comprende una forma de dosificación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y una forma de dosificación de un antimetabolito, en el que el antimetabolito se selecciona de 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, capecitabina, decitabina, floxuridina, aminopterina, metotrexato, pemetrexed y raltitrexed; e instrucciones para el uso de ambos fármacos en combinación sinérgica como se describe en cualquier reivindicación precedente.

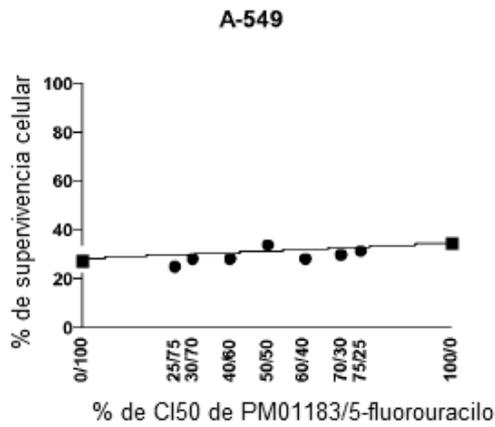


Figura 1

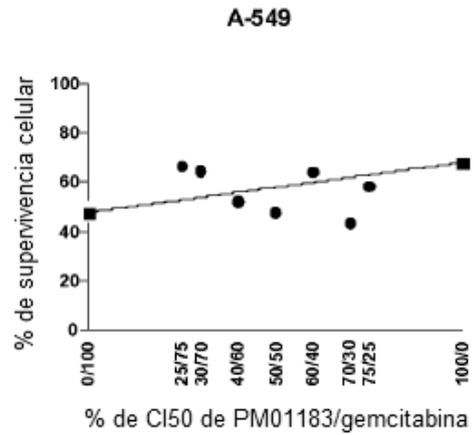


Figura 2

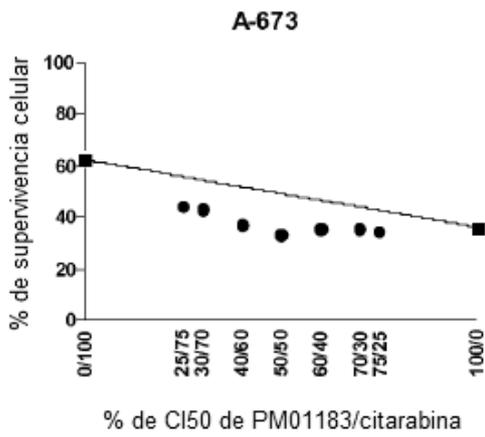


Figura 3

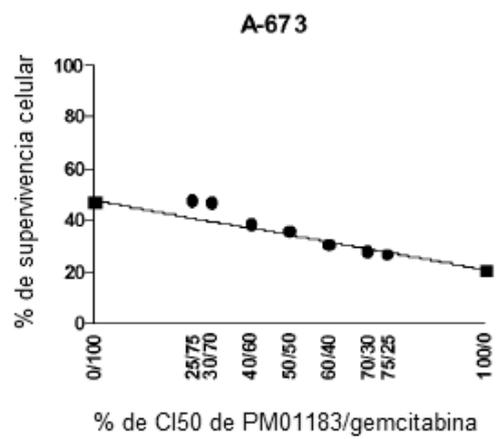


Figura 4

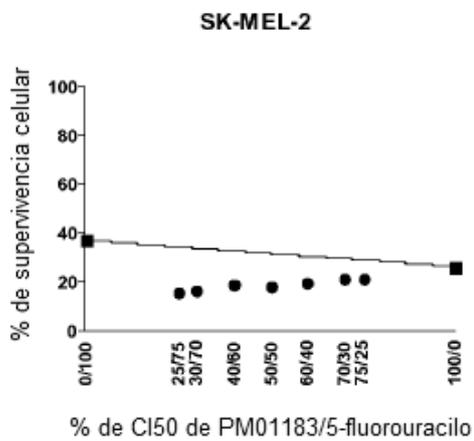


Figura 5

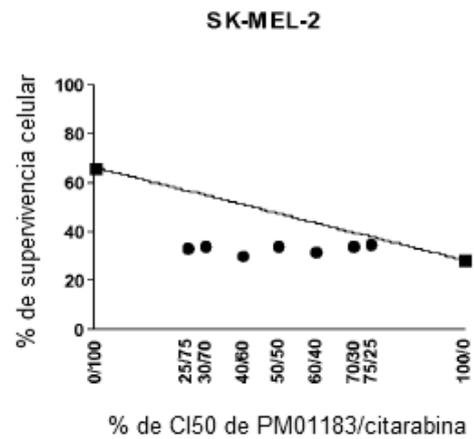


Figura 6

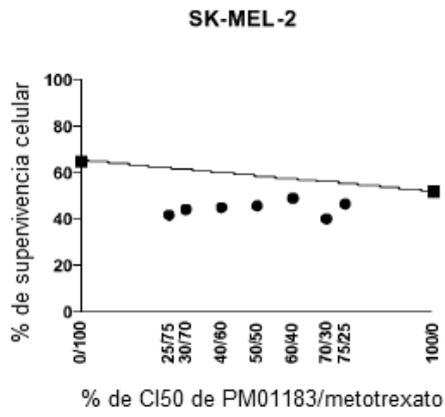


Figura 7

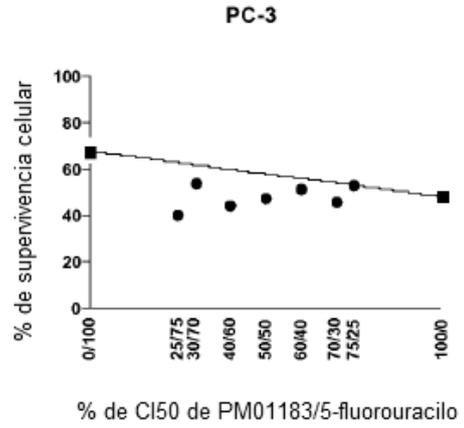


Figura 8

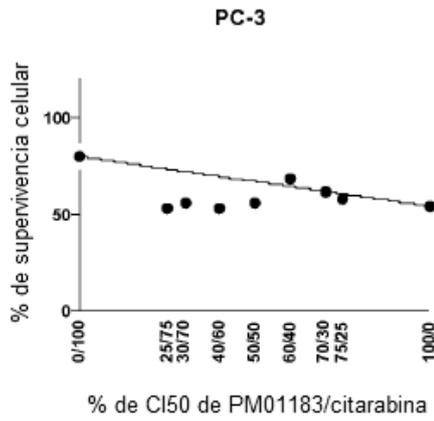


Figura 9

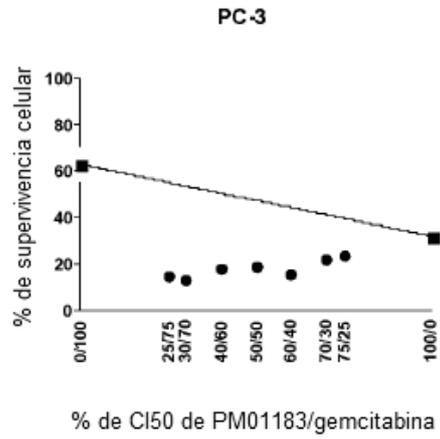


Figura 10

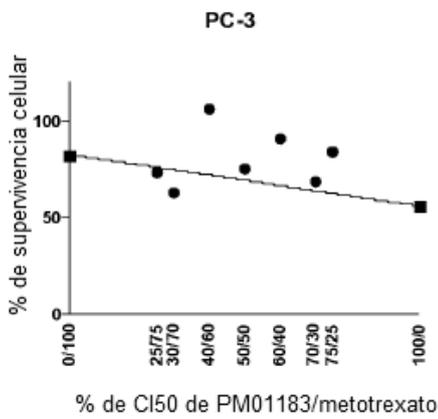


Figura 11

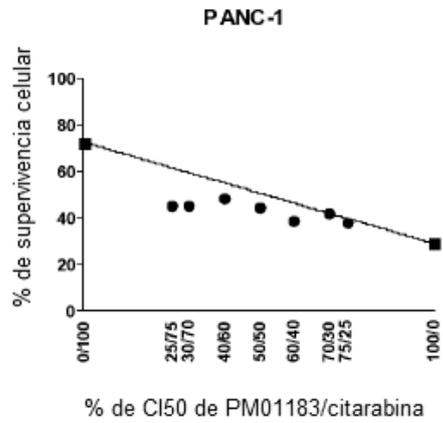


Figura 12

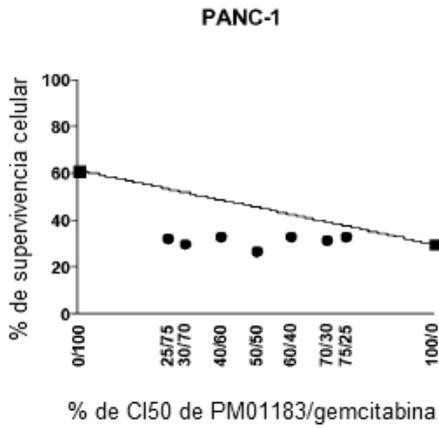


Figura 13

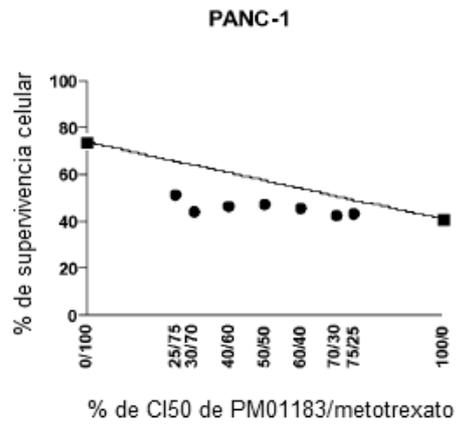


Figura 14

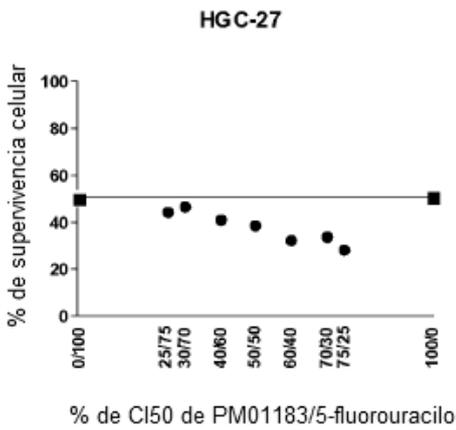


Figura 15

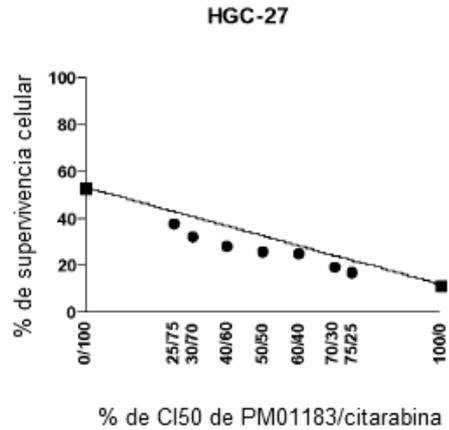


Figura 16

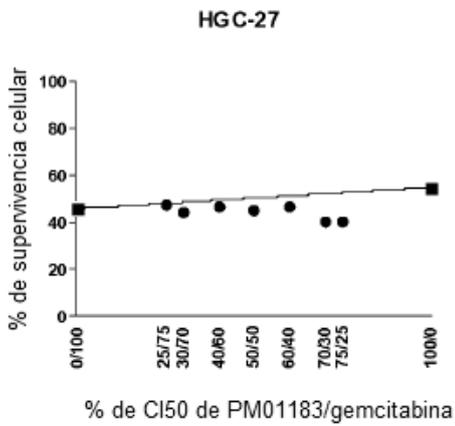


Figura 17

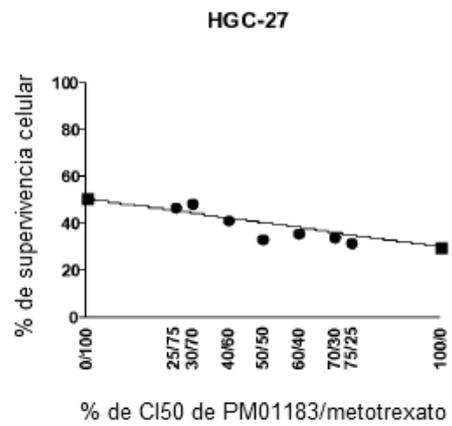


Figura 18

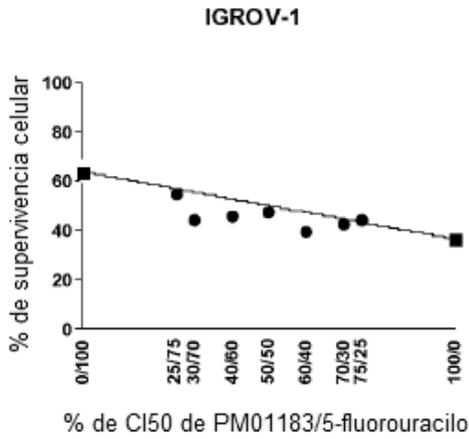


Figura 19

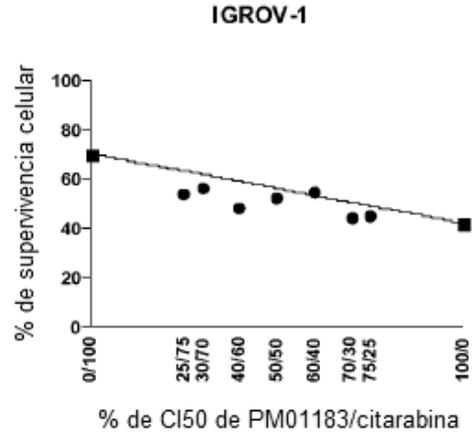


Figura 20

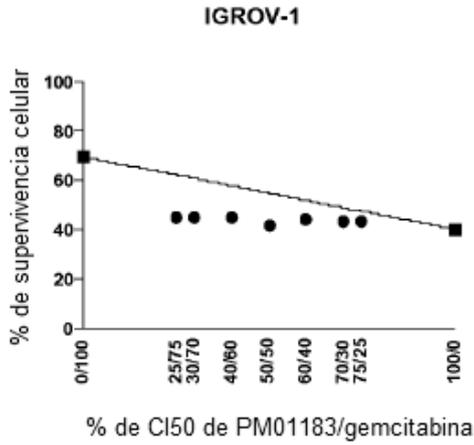


Figura 21

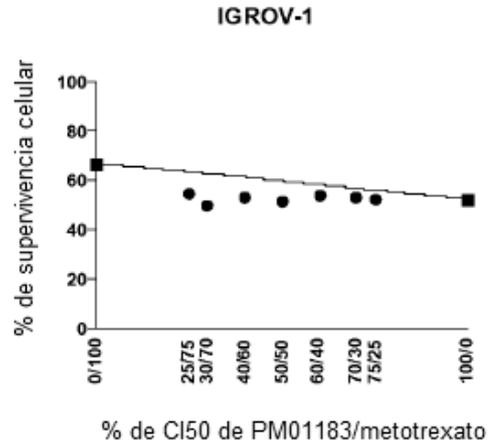


Figura 22

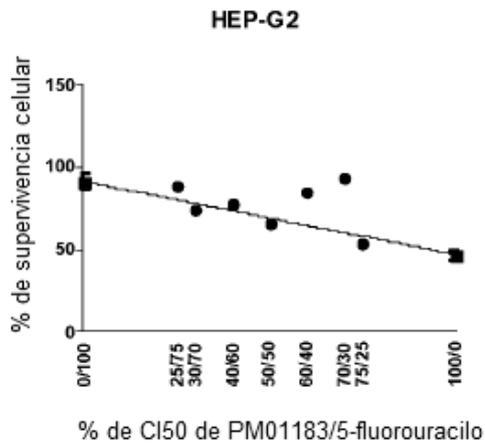


Figura 23

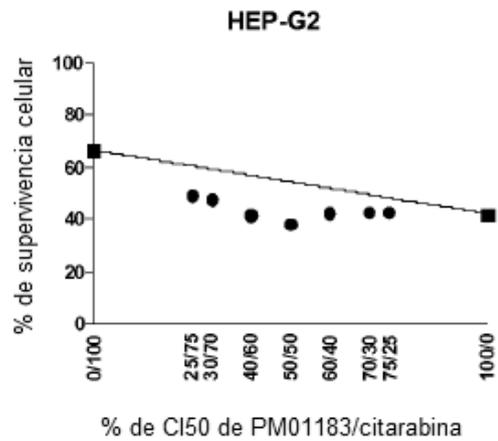


Figura 24

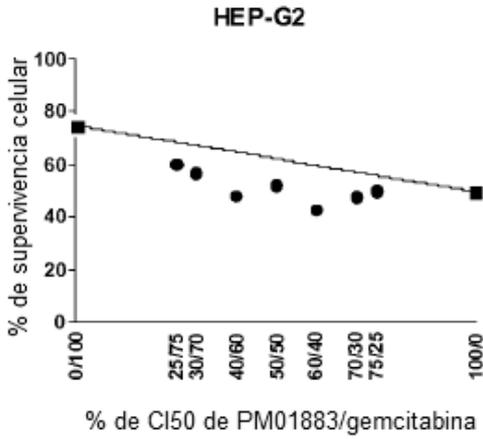


Figura 25

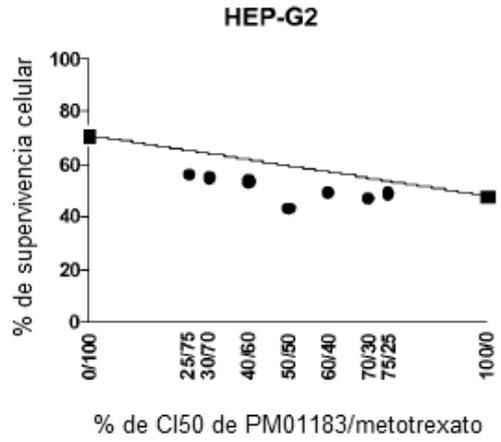


Figura 26

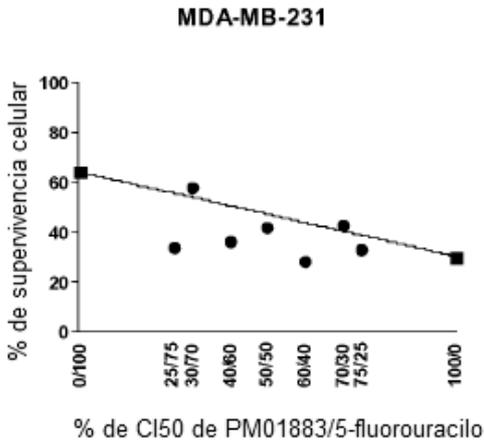


Figura 27

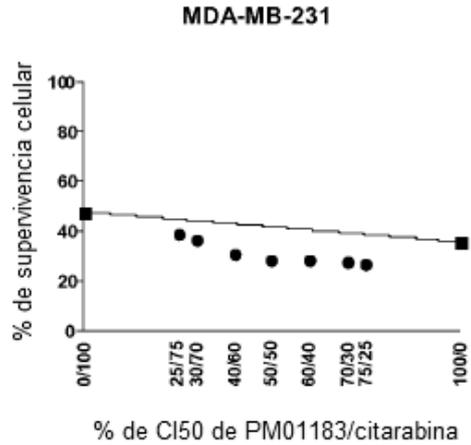


Figura 28

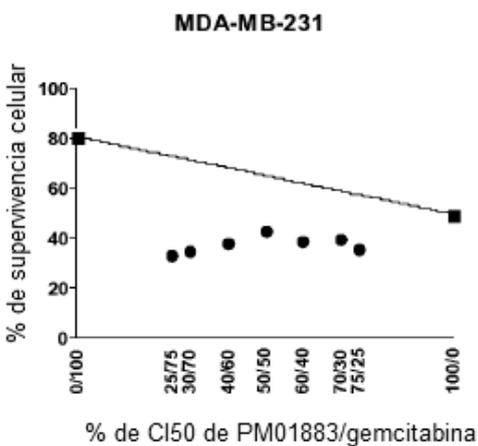


Figura 29

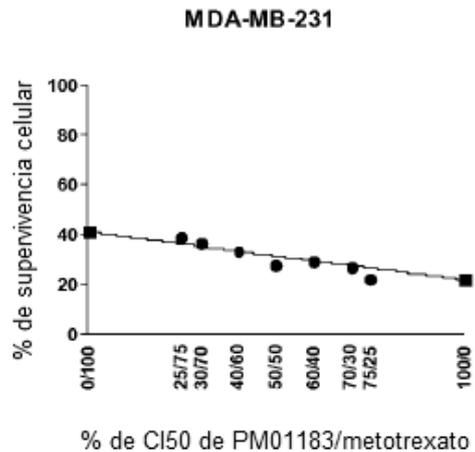


Figura 30

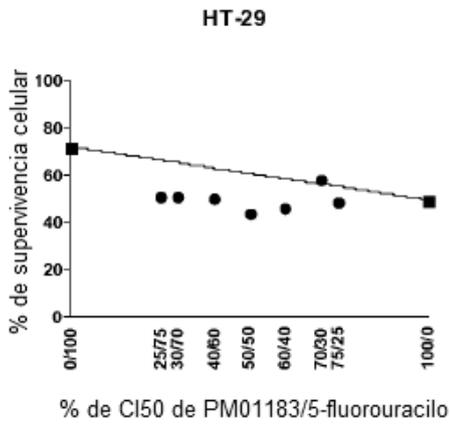


Figura 31

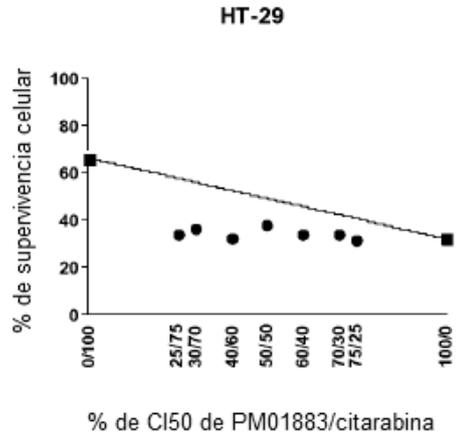


Figura 32

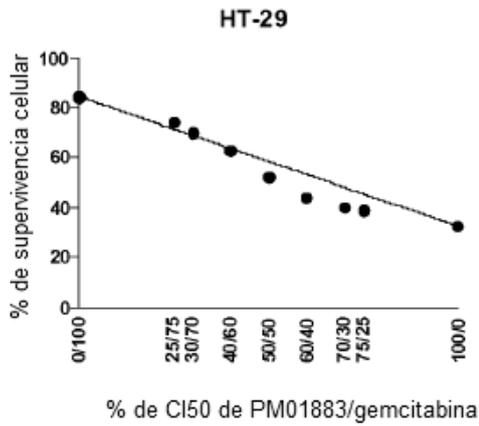


Figura 33

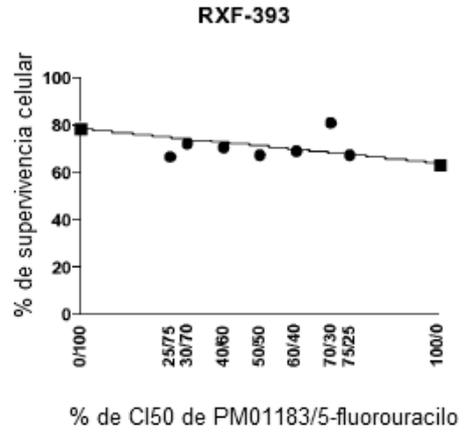


Figura 34

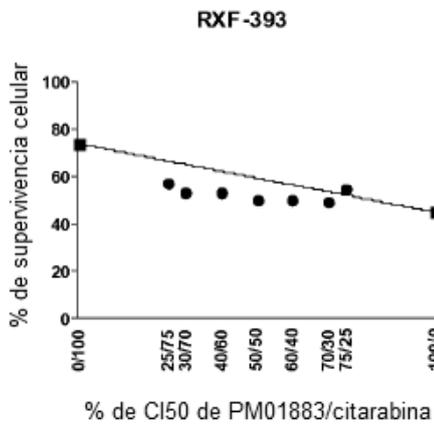


Figura 35

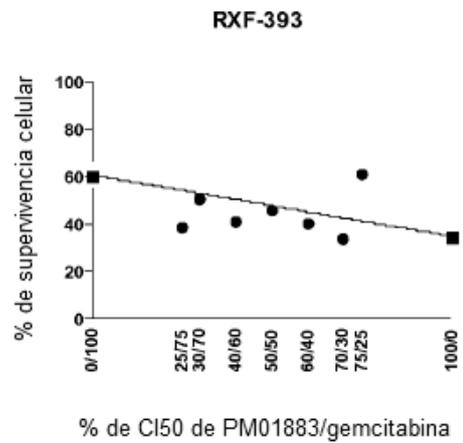


Figura 36

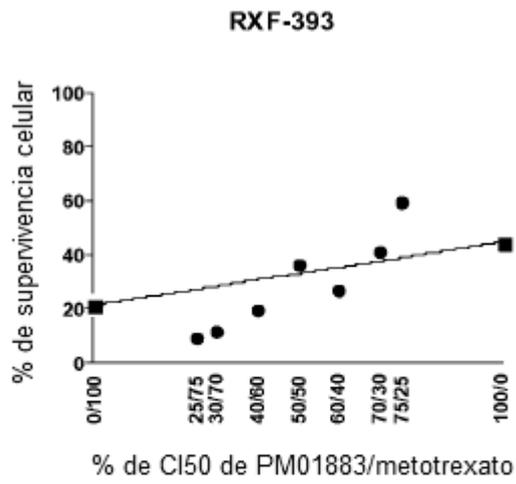


Figura 37

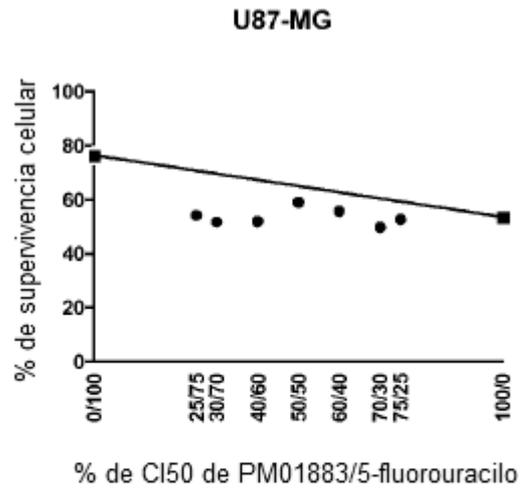


Figura 38

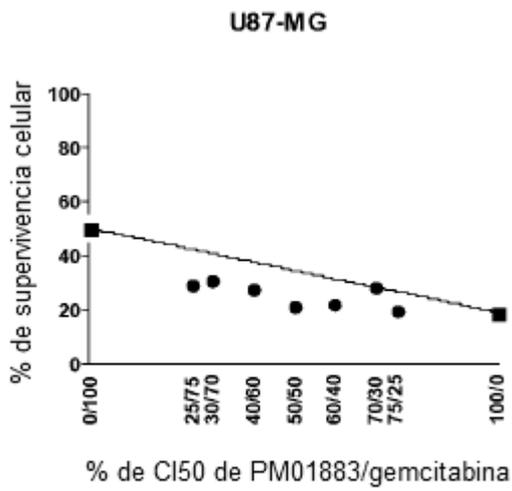


Figura 39

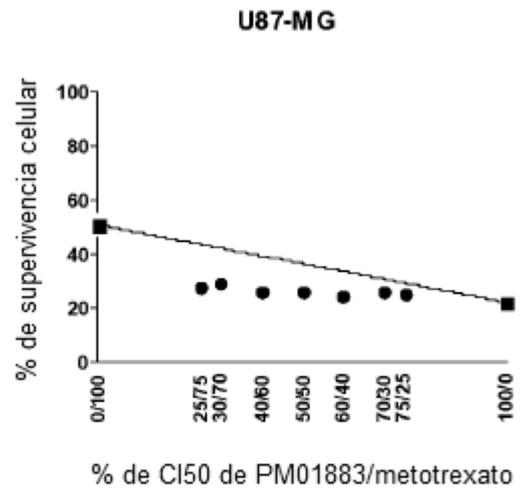


Figura 40

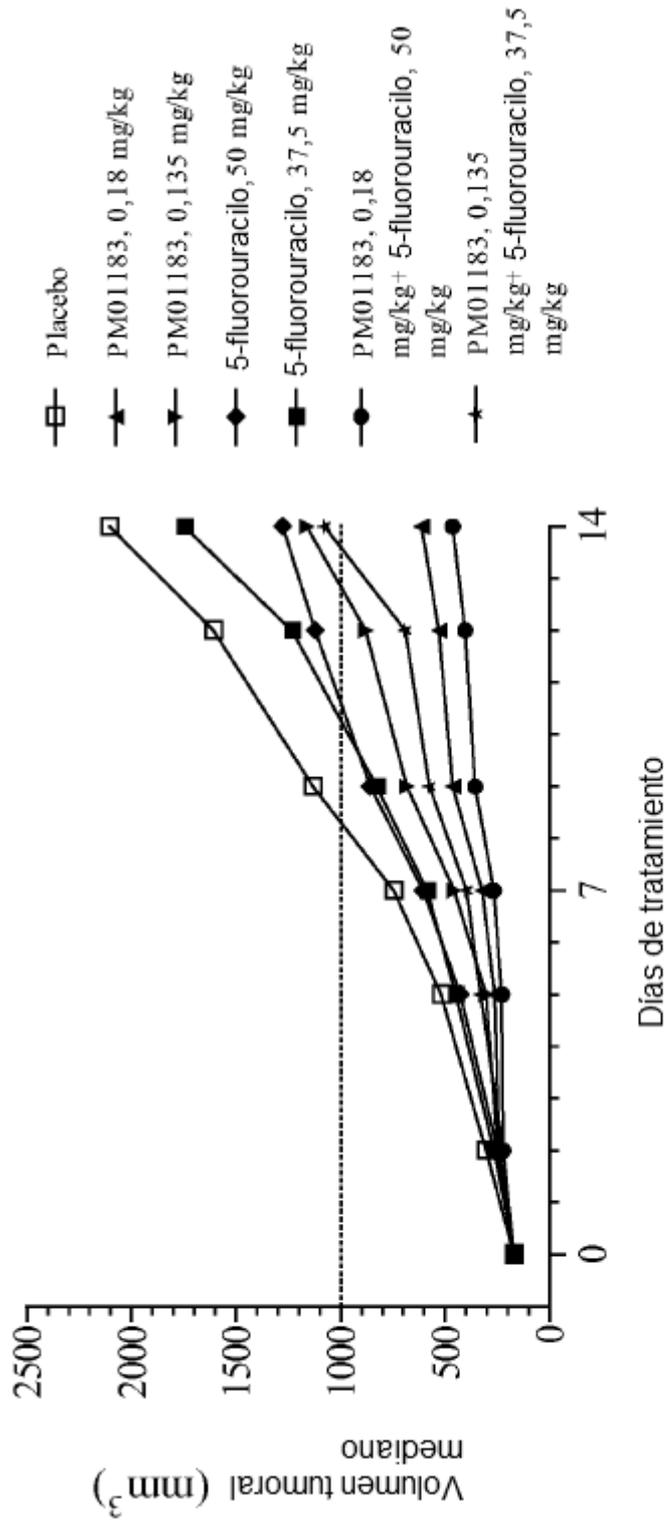


Figura 41

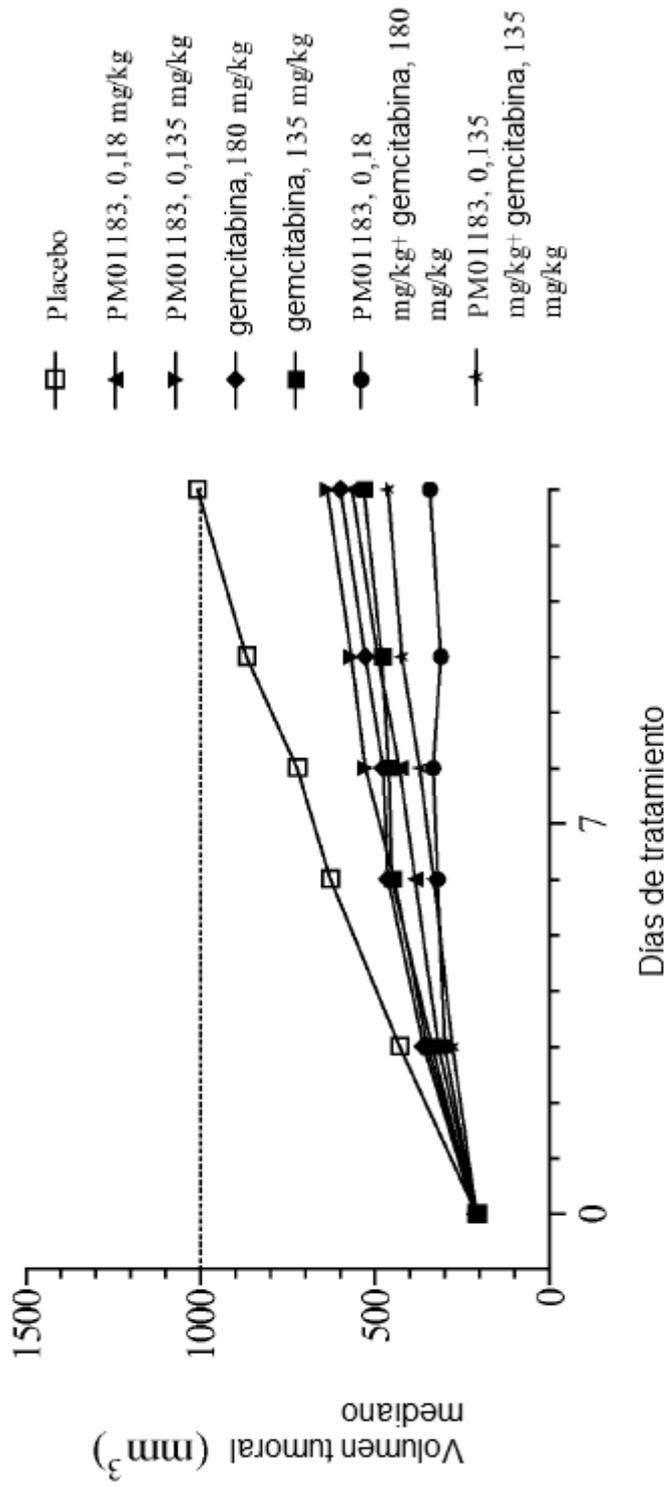


Figura 42

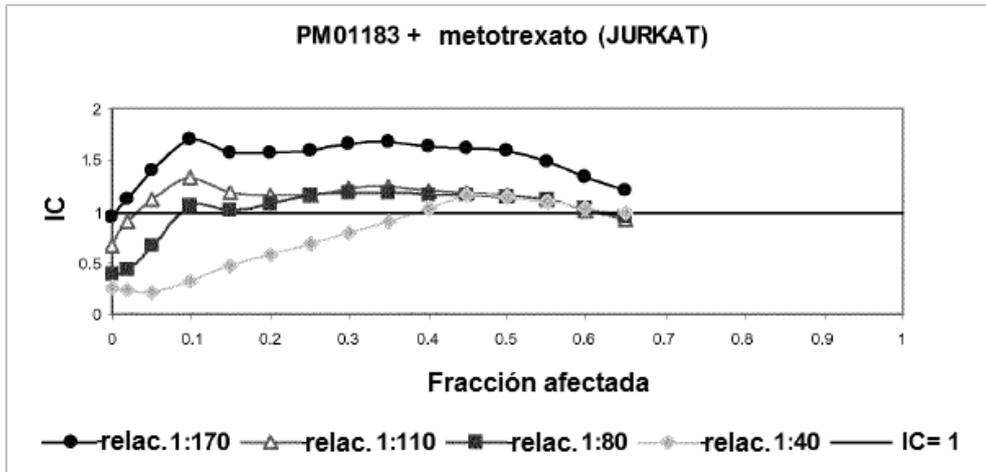


Figura 43

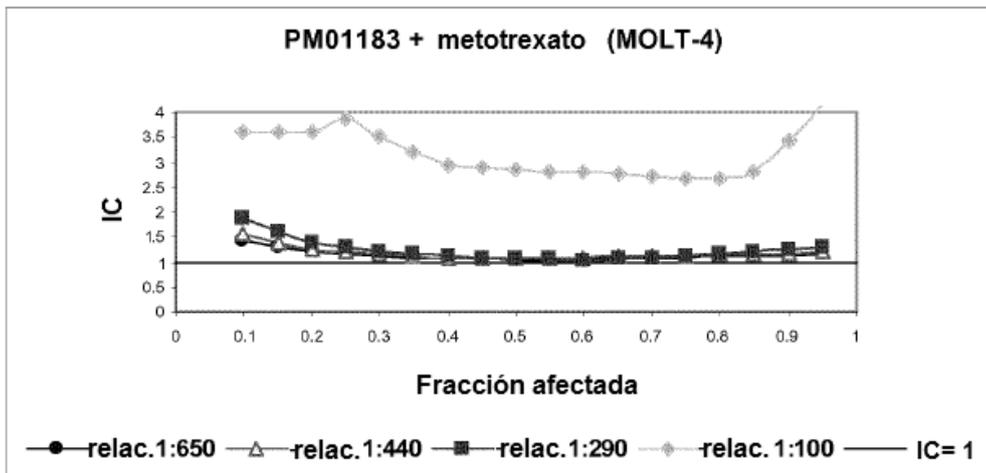


Figura 44

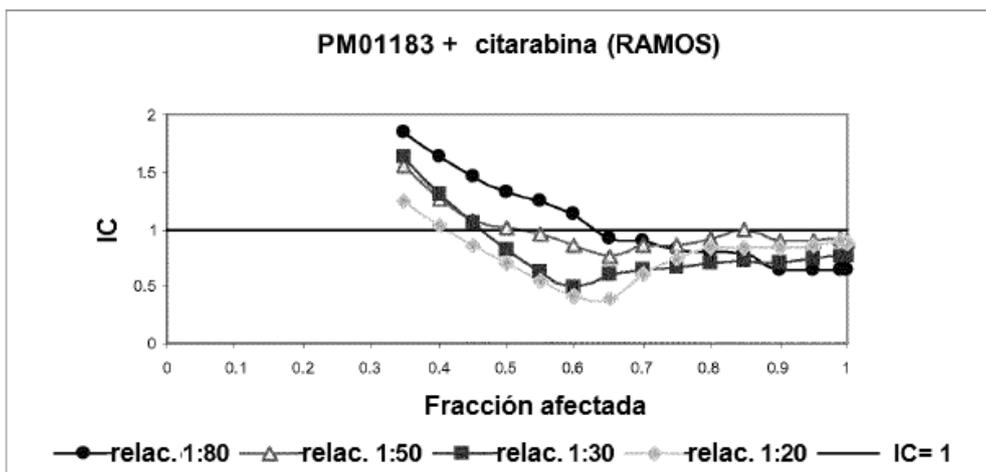


Figura 45

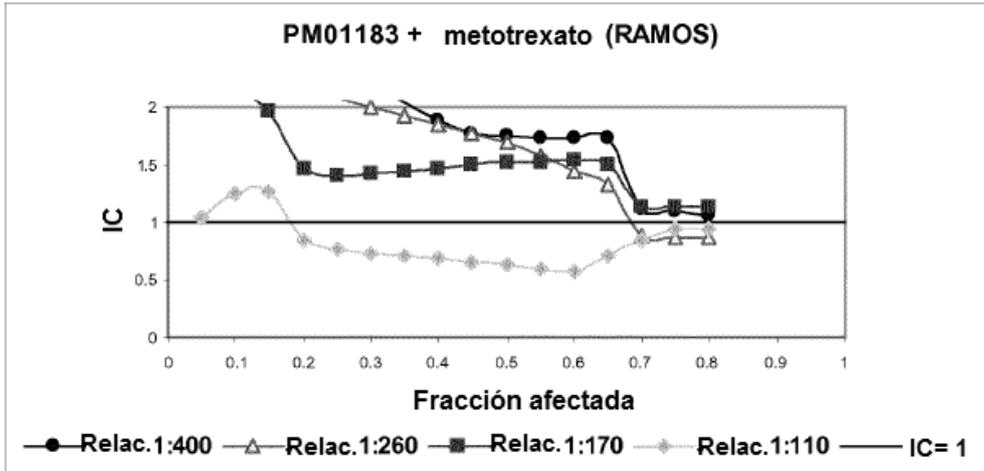


Figura 46

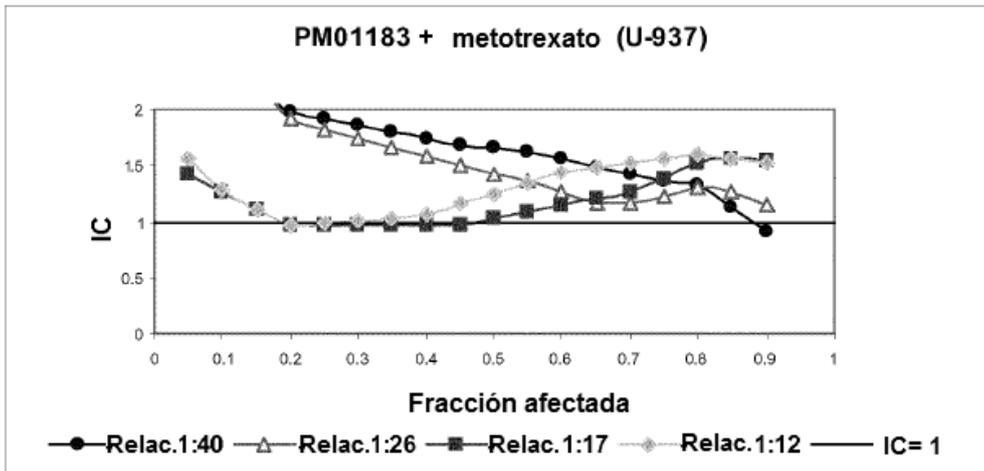


Figura 47

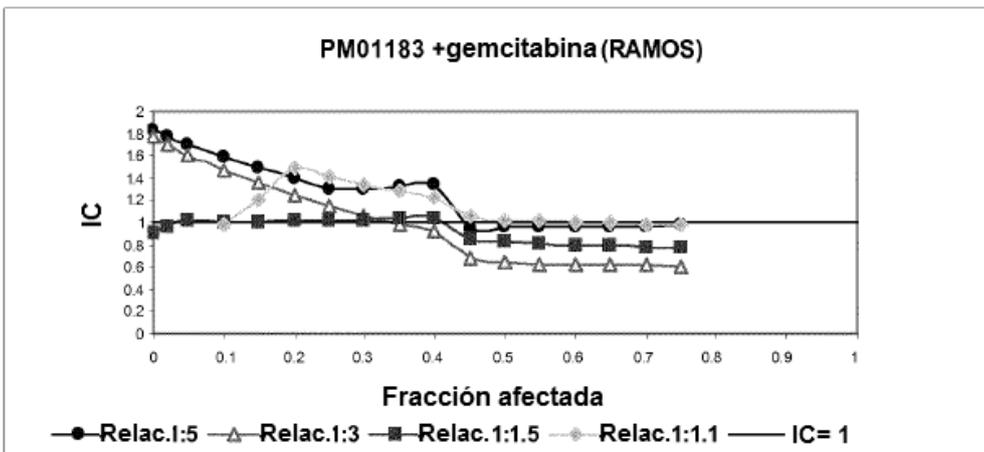


Figura 48

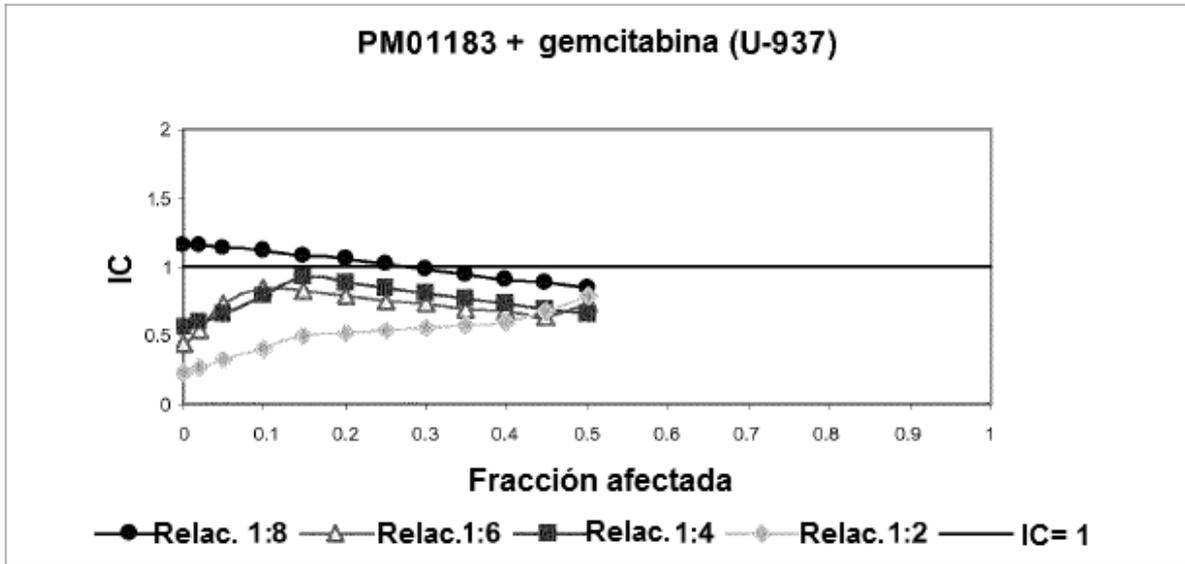


Figura 49