

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 518**

51 Int. Cl.:

A61K 38/15 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 45/08 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07757603 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2029155**

54 Título: **Tratamiento mejorado de mieloma múltiple**

30 Prioridad:

28.02.2006 US 813606 P

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

29.06.2016

73 Titular/es:

**PHARMA MAR S.A. (100.0%)
AVDA. DE LOS REYES 1, POLIGONO
INDUSTRIAL LA MINA
28770 COLMENAR VIEJO, MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**FAIRCLOTH, GLYNN THOMAS;
AVILES MARIN, PABLO MANUEL;
LEPAGE, DOREEN;
SAN MIGUEL IZQUIERDO, JESUS y
PANDIELLA, ATANASIO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 575 518 T3

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

DESCRIPCIÓN

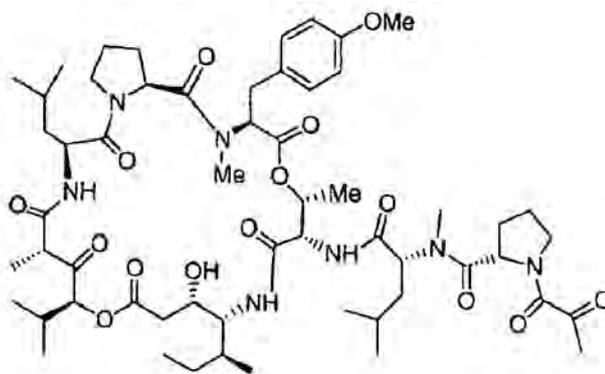
Tratamiento mejorado de mieloma múltiple

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una combinación sinérgica de Aplidina con dexametasona para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple.

Antecedentes de la invención

La Aplidina (Deshidrodidemnina B) es un depsipéptido cíclico que se aisló de un tunicado marino del Mediterráneo, *Aplidium albicans*, y es el objeto del documento WO 9104985. Está relacionada con compuestos conocidos como didemninas, y tiene la siguiente estructura:



Se puede encontrar más información sobre la Aplidina, análogos de la Aplidina, sus usos, formulaciones y síntesis en las solicitudes de patente WO 99 42125, WO 01 35974, WO 01 76616, WO 02 30441, WO 02 02596, WO 03 33013 y WO 2004 080477.

Tanto en estudios preclínicos en animales como en estudios clínicos de Fase I en seres humanos, la Aplidina ha demostrado tener un potencial citotóxico frente a un amplio espectro de tipos de tumores que incluyen la leucemia y el linfoma. Véanse, por ejemplo,

Faircloth, G. y col.: "Dehydrodidemnin B (DDB) a new marine derived anticancer agent with activity against experimental tumour models", 9^o NCI-EORTC Symp. *New Drugs Cancer Ther.* (Marzo 12-15, Amsterdam) 1996, *Abst* 111;

Faircloth, G. y col.: "Preclinical characterization of aplidine, a new marine anticancer depsipeptide", *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 1997, 38: *Abst* 692;

Deppenbrock H, Peter R, Faircloth GT, Manzanares I, Jimeno J, Hanauske AR.: "In vitro activity of Aplidine, a new marine-derived anticancer compound, on freshly explanted clonogenic human tumour cells and haematopoietic precursor cells" *Br. J. Cancer*, 1998; 78: 739-744;

Faircloth G, Grant W, Nam S, Jimeno J, Manzanares I, Rinehart K.: "Schedule-dependency of Aplidine, a marine depsipeptide with antitumor activity", *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1999; 40: 394;

Broggini M, Marchini S, D'Incalci M, Tarabozetti G, Giavazzi R, Faircloth G, Jimeno J.: "Aplidine blocks VEGF secretion and VEGF/VEGF-R1 autocrine loop in a human leukemic cell line", *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 (supl): 4509;

Erba E, Bassano L, Di Liberti G, Muradore I, Chiorino G, Ubezio P, Vignati S, Codegoni A, Desiderio MA, Faircloth G, Jimeno J y D'Incalci M.: "Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumour cells induced by aplidine", *Br. J. Cancer* 2002; 86: 1510-1517;

Paz-Ares L, Anthony A, Pronk L, Twelves C, Alonso S, Cortes-Funes H, Celli N, Gomez C, Lopez-Lazaro L, Guzman C, Jimeno J, Kaye S.: "Phase I clinical and pharmacokinetic study of aplidine, a new marine didemnin, administered as 24-hour infusion weekly" *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 (supl): 4509;

Raymond E, Ady-Vago N, Baudin E, Ribrag V, Faivre S, Lecot F, Wright T, Lopez Lazaro L, Guzman C, Jimeno J, Ducreux M, Le Chevalier T, Armand JP.: "A phase I and pharmacokinetic study of aplidine given as a 24-hour continuous infusion every other week in patients with solid tumor and lymphoma", *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 (supl): 4510;

Maroun J, Belanger K, Seymour L, Soulieres D, Charpentier D, Goel R, Stewart D, Tomiak E, Jimeno J, Matthews S.: "Phase I study of aplidine in a 5 day bolus q 3 weeks in patients with solid tumors and lymphomas", *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 (supl): 4509;

Izquierdo MA, Bowman A, Martinez M, Cicchella B, Jimeno J, Guzman C, Germa J, Smyth J.: "Phase I trial of Aplidine given as a 1 hour intravenous weekly infusion in patients with advanced solid tumors and lymphoma", *Clin. Cancer Res.* 2000; 6 (supl): 4509.

Estudios mecánicos indican que la Aplidina puede bloquear la secreción del VEGF en células ALL-MOLT4 y se ha observado actividad citotóxica *in vitro* a bajas concentraciones (5 nM) en muestras de AML y ALL de pacientes pediátricos con ALL y AML *de novo* o recurrente. La Aplidina parece inducir una detención tanto de la G1 como la G2 en células de leucemia tratadas con fármaco *in vitro*. Aparte de la regulación negativa del receptor del VEGF, poco más se sabe del modo o modos de acción de la Aplidina.

En estudios clínicos de fase I con Aplidina, se administró L-carnitina como pretratamiento de 24 h o se administró conjuntamente para prevenir la mielotoxicidad; véase, por ejemplo, el documento WO 02 30441. La administración conjunta de L-carnitina ha demostrado ser capaz de mejorar la recuperación de la toxicidad muscular inducida con fármacos y ha permitido el aumento progresivo de la dosis de Aplidina.

Previamente, ensayos *in vitro* e *in vivo* efectuados con Aplidina en combinación con otros agentes antitumorales mostraron que las combinaciones de fármacos ensayadas eran útiles en la terapia de combinación para el tratamiento de la leucemia y el linfoma. En el documento WO 2004 080421, se evaluó específicamente la Aplidina en combinación con metotrexato, arabinósido de citosina, mitoxantrona, vinblastina, metilprednisolona y doxorubicina para el tratamiento de la leucemia y el linfoma.

El documento WO 02/30441 describe un estudio de Fase I de la Aplidina administrada junto con un protector del músculo esquelético, tal como la L-carnitina, para el tratamiento del cáncer. El documento WO 01/35974 describe también estudios clínicos de fase I de la Aplidina, en los que se proporcionan diversas dosificaciones y protocolos para el tratamiento del cáncer.

El documento WO 03/033013 describe que diversos ensayos *in vivo* efectuados con Aplidina eran útiles para el tratamiento del cáncer pancreático.

El documento WO 2004/080477 describe que diversos ensayos *in vitro* efectuados con Aplidina indican que este agente puede ser útil para el tratamiento del mieloma múltiple.

Puesto que el cáncer es la principal causa de muerte en animales y humanos, se han realizado, y se siguen realizando, diversos esfuerzos a fin de conseguir una terapia antitumoral activa y segura para ser administrada a pacientes que padecen cáncer. El problema que ha de resolver la presente invención es proporcionar terapias antitumorales que sean útiles en el tratamiento del cáncer.

Sumario de la invención

La presente invención se desvela en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- Fig. 1.** Un ejemplo de análisis de regresión lineal que es un procedimiento para revelar la presencia de sinergias.
- Fig. 2.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con paclitaxel (Taxol®) frente a células SKBR3.
- Fig. 3.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con paclitaxel (Taxol®) frente a células MOLT3.
- Fig. 4.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con paclitaxel (Taxol®) frente a células PC3.
- Fig. 5.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con paclitaxel (Taxol®) frente a células HL60.
- Fig. 6.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con paclitaxel (Taxol®) frente a células MX1.
- Fig. 7.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con paclitaxel (Taxol®) frente a células A549.
- Fig. 8.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con doxorubicina (DOX) frente a células A549.
- Fig. 9.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidine®) en combinación con doxorubicina (DOX) frente HT células HT29.
- Fig. 10.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con doxorubicina (DOX) frente a células PC3.
- Fig. 11.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con doxorubicina (DOX) frente a células MOLT3.
- Fig. 12.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidine®) en combinación con doxorubicina (DOX) frente a células MX1.
- Fig. 13.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidine®) en combinación con doxorubicina (DOX) frente a células SKBR3.
- Fig. 14.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (AP, Aplidin®) en combinación con cisplatino (DDP) frente a células MX1.
- Fig. 15.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con cisplatino (cis-DDP) frente a células HT29.

- Fig. 16.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (APL, Aplidin®) en combinación con cisplatino (cisDDP, DDP) frente a células SKBR3.
- Fig. 17.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con cisplatino (cis-DDP, DDP) frente a células MOLT3.
- 5 **Fig. 18.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidine®) en combinación con cisplatino (cis-DDP, DDP) frente a células A549.
- Fig. 19.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con trióxido de arsénico (TRI) frente a células A549.
- 10 **Fig. 20.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidine®) en combinación con trióxido de arsénico (TRI) frente a células HT29.
- Fig. 21.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con trióxido de arsénico (TRI) frente a células PC3.
- Fig. 22.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con trióxido de arsénico (TRI) frente a células MOLT3.
- 15 **Fig. 23.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con 5-fluorouracilo (5FU) frente a células HL60.
- Fig. 24.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con 5-fluorouracilo (5FU) frente a células SKBR3.
- 20 **Fig. 25.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con 5-fluorouracilo (5FU) frente a células A549.
- Fig. 26.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con 5-fluorouracilo (5FU) frente a células PC3.
- Fig. 27.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con 5-fluorouracilo (5FU) frente a células HT29.
- 25 **Fig. 28.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con arabinósido de citosina (AraC) frente a células SKBR3.
- Fig. 29.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con arabinósido de citosina (AraC) frente a células A549.
- 30 **Fig. 30.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con arabinósido de citosina (AraC) frente a células PC3.
- Fig. 31.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con arabinósido de citosina (AraC) frente a células HL60.
- Fig. 32.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con arabinósido de citosina (AraC) frente a células HT29.
- 35 **Fig. 33.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células PC3.
- Fig. 34.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células HT29.
- 40 **Fig. 35.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células A549.
- Fig. 36.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células MOLT3.
- Fig. 37.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células MX1.
- 45 **Fig. 38.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con SN-38 frente a células A549.
- Fig. 39.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con SN-38 frente a células SKBR3.
- Fig. 40.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con SN-38 frente a células HL60.
- Fig. 41.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con SN-38 frente a células PC3.
- 50 **Fig. 42A y 42B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células HL-60.
- Fig. 43A y 43B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células K562.
- Fig. 44A y 44B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células MOLT-3.
- 55 **Fig. 45A y 45B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células MC 116.
- Fig. 46A y 46B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células RAMOS.
- Fig. 47A y 47B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células U937.
- 60 **Fig. 48A y 48B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células NCI-H929.
- Fig. 49A y 49B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células HUNS-1.
- 65 **Fig. 50A y 50B.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células U266 B1.

Fig. 51A y 51B. Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (A, Aplidin®) en combinación con VP16 (B) frente a células RPMI 8226.

Fig. 52. Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células LOX-I-MVI.

5 **Fig. 53.** Datos de actividad *in vitro* de la Aplidina (Aplidin®) en combinación con carboplatino frente a células UACC-257.

Fig. 54. Respuesta a la dosis de Aplidina tras (tratamiento de 48 h) en las líneas celulares MM1S, MM1R, U266 y U266-LR7.

10 **Fig. 55.** Comparación de la eficacia de dosis de la Aplidina (Aplidin®) y otros fármacos en la línea celular MM1S (48 h de tratamiento).

Fig. 56. Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Dexametasona a los 3 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 57. Combinación de Aplidina (Aplidine®) y Dexametasona a los 6 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

15 **Fig. 58.** Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Melfalán a los 3 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 59. Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Melfalán a los 6 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 60. Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Doxorrubicina a los 3 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 61. Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Doxorrubicina a los 6 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

20 **Fig. 62.** Combinación de Aplidina (Aplidine®) y Lenalidomida (Revlimid®) a los 3 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 63. Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Lenalidomida (Revlimid®) a los 6 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 64. Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Bortezomib a los 3 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

25 **Fig. 65.** Combinación de Aplidina (Aplidin®) y Bortezomib a los 6 días. A) Curva dosis-efecto. B) Gráfico Fa-IC.

Fig. 66. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (Aplidin®) como único agente o en combinación con Dacarbazina en xenoinjertos tumorales de melanoma MRI-H-187.

Fig. 67. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (Aplidin®) como único agente o en combinación con Carboplatino en xenoinjertos tumorales de melanoma MRI-H-187.

30 **Fig. 68.** Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (Aplidin®) como único agente o en combinación con Interleucina-2 (IL-2) en xenoinjertos tumorales de melanoma MRI-H-187.

Fig. 69. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (Aplidin®) como único agente o en combinación con Interferón- α 2a (INF- α) en xenoinjertos tumorales de melanoma MRI-H-187.

Fig. 70. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Dacarbazina (DTIC) en xenoinjertos tumorales de melanoma LOX-IMVI.

35 **Fig. 71.** Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Carboplatino en xenoinjertos tumorales de melanoma LOX-IMVI.

Fig. 72. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL, Aplidin®) como único agente o en combinación con Interleucina-2 (IL-2) en xenoinjertos tumorales de melanoma LOX-IMVI.

40 **Fig. 73.** Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL, Aplidin®) como único agente o en combinación con Interferón- α 2a (INF- α) en xenoinjertos tumorales de melanoma LOX-IMVI.

Fig. 74. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Bevacizumab (Avastin®) en xenoinjertos de tumor renal CaKi-1.

Fig. 75. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Interleucina-2 (IL-2) en xenoinjertos de tumor renal CaKi-1.

45 **Fig. 76.** Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Interferón- α 2a (INF- α 2a) en xenoinjertos de tumor renal CaKi-1.

Fig. 77. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Bevacizumab (Avastin®) en xenoinjertos de tumor renal MRI-H-121.

50 **Fig. 78.** Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Interleucina-2 (IL-2) en xenoinjertos de tumor renal MRI-H-121.

Fig. 79. Cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como único agente o en combinación con Interferón- α 2a (INF- α) en xenoinjertos de tumor renal MRI-H121.

55 **Fig. 80.** Combinación de Aplidina (A) + Lenalidomida (Revlimid®; R) + Dexametasona en MM1S tras 72 h de tratamiento. Las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Lenalidomida se expresan en unidades μ M y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

Fig. 81. Combinación de Aplidina (A) + Bortezomib (B) + Dexametasona (D) en MM1S tras 72 h de tratamiento. Las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Bortezomib se expresan en unidades nM y

las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

60 **Fig. 82.** Combinación de Aplidina (A) + Bortezomib (B) + Lenalidomida (Revlimid®; R) en MM1S tras 72 h de tratamiento. Las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Bortezomib se expresan en unidades nM y las dosis de Lenalidomida se expresan en unidades μ M.

Fig. 83. Combinación de Aplidina (A) + Talidomida (T) + Dexametasona (D) en MM1S tras 72 h de tratamiento. Las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Talidomida se expresan en unidades μ M y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

Fig. 84. Combinación de Aplidina (A) + Melfalán (M) + Dexametasona (D) en MM1S tras 72 h de tratamiento. Las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Melfalán se expresan en unidades μM y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

5 **Fig. 85.** Combinación de Aplidina (A) + Melfalán (M) + Bortezomib (B) en MM1S tras 72 h de tratamiento. Las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Melfalán se expresan en unidades μM y las dosis de Bortezomib se expresan en unidades nM.

Descripción detallada de la invención

Mediante "cáncer" se pretende incluir tumores, neoplasias y cualquier otra célula o tejido maligno. La presente invención se refiere al uso de la Aplidina en combinación para el tratamiento del mieloma múltiple.

10 Aunque no de acuerdo con la presente invención, los autores describen adicionalmente, el uso de un análogo de la Aplidina en combinación para los tratamientos del cáncer en general, si bien más preferentemente para el tratamiento del cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer de próstata, el cáncer renal, el melanoma, la leucemia y el linfoma.

15 A fin de estudiar la posible potenciación de otros agentes antitumorales con Aplidina los autores iniciaron un estudio sistemático de combinaciones de fármacos para su posible uso en los tipos de cáncer anteriormente mencionados. Los estudios de combinación de fármacos se llevaron a cabo en diferentes tipos de líneas celulares. Los estudios *in vitro* se efectuaron usando líneas de células tumorales tales como NSCL A549, carcinoma de mama MX1, leucemia promielocítica HL60, adenocarcinoma de colon HT29, adenocarcinoma de próstata PC3, adenocarcinoma de mama SKBR3 y leucemia linfoblástica aguda (MOLT3), que tienen diferente sensibilidad a la Aplidina (de baja a alta). Se llevaron a cabo estudios adicionales con líneas celulares de leucemias, linfomas, mieloma múltiple y melanoma.

20 Además, se efectuaron estudios *in vivo* usando xenoinjertos de melanoma, renales, de mieloma y de linfoma para establecer el efecto de la Aplidina en combinación con otros agentes convencionales. Finalmente, se llevaron a cabo estudios *in vitro* en líneas celulares de mieloma múltiple usando combinaciones triples, es decir, combinando la Aplidina con dos agentes convencionales adicionales (un segundo y un tercer fármaco).

25 Aunque no de acuerdo con la presente invención, como conclusión general los autores han descubierto que la citotoxicidad de la Aplidina en células tumorales se potencia enormemente en combinación con muchos de los agentes convencionales usados para esta evaluación. El principal efecto sinérgico se observó con la combinación de Aplidina con paclitaxel (Taxol®), doxorubicina, cisplatino, trióxido de arsénico, 5-fluorouracilo (5-FU), arabinósido de citosina (AraC), carboplatino, 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN38), etopósido (VP16), melfalán, dexametasona, ciclofosfamida, bortezomib, erlotinib, trastuzumab, lenalidomida (Revlimid®), interleucina-2 (IL-2), interferón- α 2 (INF- α), dacarbazina (DTIC), bevacizumab (Avastin®), idarrubicina, talidomida, y rituximab. Adicionalmente, se descubrió también que se obtenía igualmente una potenciación de la citotoxicidad con combinaciones triples de Aplidina con los agentes mencionados anteriormente.

35 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con paclitaxel en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, leucemia y cáncer de próstata.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con doxorubicina en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, y mieloma múltiple.

40 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con cisplatino en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama y cáncer de colon.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con trióxido de arsénico en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de próstata.

45 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de próstata.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con arabinósido de citosina en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de próstata.

50 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con carboplatino en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cáncer de colon, cáncer de próstata, y melanoma.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con SN38 en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del cáncer de pulmón.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con etopósido en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de un cáncer seleccionado entre linfoma y mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con dexametasona en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

- 5 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con lenalidomida en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con bortezomib en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

- 10 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con dacarbazina en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del melanoma.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con bevacizumab en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del cáncer renal.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con interleucina-2 en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del cáncer renal.

- 15 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con melfalán en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con idarrubicina en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento de la leucemia.

- 20 Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con rituximab en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del linfoma.

Particularmente preferente es la combinación de Aplidina con talidomida en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con lenalidomida y dexametasona en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

- 25 Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con bortezomib y dexametasona en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con bortezomib y lenalidomida en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

- 30 Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con bortezomib y talidomida en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con dexametasona y talidomida en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con dexametasona y melfalán en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

- 35 Particularmente preferente es la combinación triple de Aplidina con melfalán y bortezomib en el tratamiento del cáncer y, más particularmente, en el tratamiento del mieloma múltiple.

La composición de la presente invención puede comprender todos los componentes (fármacos) en una única formulación farmacéuticamente aceptable. De modo alternativo, los componentes se pueden formular por separado y se pueden administrar en combinación unos con otros. En la presente invención se pueden usar diversas formulaciones farmacéuticamente aceptables bien conocidas por los expertos en la materia. La selección de la formulación apropiada para su uso en la presente invención puede ser efectuada de modo rutinario por los expertos en la materia en base al modo de administración y las características de solubilidad de los componentes de la composición.

- 40 Ejemplos de composiciones farmacéuticas que contienen Aplidina o un análogo de Aplidina incluyen composiciones líquidas (soluciones, suspensiones o emulsiones) adecuadas para administración intravenosa, y estas pueden contener el compuesto puro o en combinación con cualquier vehículo u otro compuesto farmacológicamente activo. La Aplidina solubilizada muestra una degradación sustancial en condiciones de ensayo de estrés lumínico y térmico, y se desarrolló una dosificación liofilizada, véase el documento WO 99 42125.

- 50 Aunque no de acuerdo con la presente invención, la administración de Aplidina o de composiciones de la presente invención se basa en un protocolo de dosificación, preferentemente mediante infusión intravenosa. Los autores

5 prefieren que se usen tiempos de infusión de hasta 72 horas, más preferentemente de 1 a 24 horas, con aproximadamente 1, aproximadamente 3 o aproximadamente 24 horas como los de mayor preferencia. Son especialmente deseables los tiempos de infusión cortos que permiten que el tratamiento se lleve a cabo sin pasar la noche en el hospital. Sin embargo, la infusión puede ser de aproximadamente 24 horas o incluso más, si es necesario. La infusión se puede llevar a cabo a intervalos adecuados con patrones diversos, a modo de ejemplo una vez a la semana, dos veces a la semana, o incluso con mayor frecuencia por semana, repetida cada semana opcionalmente con interrupciones normalmente de una o varias semanas.

10 La correcta dosificación de los compuestos de la combinación variará de acuerdo con la formulación particular, el modo de aplicación, y el sitio, huésped y tumor particular que se va a tratar. Se han de tener en cuenta otros factores tales como la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la condición del huésped, las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la gravedad de la enfermedad. La administración se puede llevar a cabo de forma continua o periódica dentro de la dosis máxima tolerada. Una guía adicional para la administración de Aplidina se da en el documento WO 01 35974.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a combinaciones sinérgicas que emplean Aplidina y dexametasona y, aunque no de acuerdo con la presente invención, se pueden emplear otras combinaciones. Se puede obtener fácilmente una indicación de sinergia ensayando combinaciones y analizando los resultados, por ejemplo mediante análisis de regresión lineal. Se hace referencia a la Figura 1 para ilustrar este punto. Procedimientos alternativos tales como el análisis de isoblogramas están disponibles para revelar la sinergia y se pueden usar para los presentes fines.

20 Ejemplos

Ejemplo 1. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otro agente convencional sobre líneas de células tumorales.

La Aplidina, en forma de agente único o en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales seleccionados, se evaluó frente a diversas líneas de células tumorales para medir las diferencias de citotoxicidad.

25 Se seleccionaron los siguientes agentes convencionales como agentes únicos y para su combinación con la Aplidina: paclitaxel (Taxol®), doxorubicina, cisplatino, trióxido de arsénico (Trisonex®), 5-fluorouracilo (5-FU), arabinósido de citosina (AraC), carboplatino y 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN38).

30 El agente único Aplidina es citotóxico para diversos tipos de cáncer con potencia variable. Por esta razón, se seleccionaron líneas de células tumorales representativas que tienen baja, media o alta sensibilidad a la Aplidina. Las líneas de células tumorales que se usaron se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo de cáncer (Línea celular)	Sensibilidad a la Aplidina
NSCL (A549)	Baja
Carcinoma de mama (MX1)	Baja
Leucemia promielocítica (HL60)	Media
Adenocarcinoma de colon (HT29)	Media
Adenocarcinoma de próstata (PC3)	Media
Adenocarcinoma de mama (SKBR3)	Alta
Leucemia linfoblástica aguda (MOLT3)	Alta

La selección se efectuó en dos partes:

35 a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada compuesto después de 72 h de exposición al fármaco en cada una de las líneas de células tumorales.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en sus respectivos medios de crecimiento a 37 °C, 5 % de CO_2 y 98 % de humedad. Ninguna de las formulaciones de los medios contenía antibióticos. El día anterior a la siembra de las células en las placas, se administró a todos los cultivos medio de crecimiento completo recién preparado. El día de la cosecha (en las placas), las células se contaron mediante el procedimiento de tinción de exclusión con azul de tripano (cultivo celular básico). Las células se cosecharon y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo en 190 μ l de medio y se incubaron durante 24 horas para permitir que las células se agregaran antes de la adición del fármaco. Las células se trataron con los fármacos y el efecto citotóxico se midió mediante el ensayo MTS (Tetrazolio), que es un procedimiento colorimétrico para determinar el número de células viables. Después de 72 horas de incubación con el fármaco, se añadieron 25 μ l de solución MTS+PMS a cada pocillo de microtitulación y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Después, las placas se retiraron de la incubadora y se

colocaron en un agitador de placa durante 5 minutos (cubiertas con papel de aluminio para protegerlas de la luz). Se leyeron las densidades ópticas a 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas. Los datos se analizaron usando el programa SoftMax® v 3.12.

- 5 Se calculó la CI_{50} , que es aproximadamente equivalente a la GI_{50} (concentración a la cual se mide una inhibición del crecimiento del 50 %). Se generó una curva de regresión usando el programa SoftMax®, y después se interpoló manualmente una concentración de inhibición del 50 % y se convirtió esa concentración en molar (M) dividiendo por el peso molecular del compuesto. Los valores CI_{50} individuales (72 horas de exposición al fármaco) se muestran en la Tabla 2. Los valores CI_{50} representan el 100 % de la concentración del fármaco.

Tabla 2

Línea celular	Tipo	Fármaco	CI_{50} (Molar)
A549	Tumor NSCL	Aplidina	3,6E-04
		paclitaxel	1,3E-08
		doxorrubicina	1,3E-06
		cisplatino	6,0E-06
		trióxido de arsénico	4,2E-04
		5-FU	1,4E-03
		AraC	> 1,0E-04
		carboplatino	3,1E-04
		SN38	1,3E-03
MX1	Adenocarcinoma de mama	Aplidina	> 1,0E-04
		paclitaxel	9,4E-06
		doxorrubicina	> 1,0E-04
		cisplatino	1,7E-04
		trióxido de arsénico	9,7E-05
		5-FU	> 1,0E-04
		AraC	> 1,0E-04
		carboplatino	> 1,0E-04
		SN38	1,5E-07
HL60	Leucemia promielocítica	Aplidina	3,0E-09
		paclitaxel	1,6E-08
		doxorrubicina	> 1,0E-04
		cisplatino	1,2E-05
		trióxido de arsénico	2,0E-05
		5-FU	1,2E-03
		AraC	1,0E-05
		carboplatino	5,6E-05
		SN38	1,0E-06
HT29	Adenocarcinoma de colon	Aplidina	> 1,0E-04
		paclitaxel	5,0E-09
		doxorrubicina	> 1,0E-04
		cisplatino	7,2E-04

(continuación)

Línea celular	Tipo	Fármaco	CI ₅₀ (Molar)
		trióxido de arsénico	8,0E-05
		5-FU	8,8E-04
		AraC	> 1,0E-04
		carboplatino	2,6E-04
		SN38	1,2E-07
PC3	Tumor de próstata	Aplidina	7,8E-08
		paclitaxel	No determinado
		doxorrubicina	1,1E-05
		cisplatino	8,7E-05
		trióxido de arsénico	1,2E-03
		5-FU	2,2E-04
		AraC	> 1,0E-04
		carboplatino	> 1,0E-04
SKBR3	Adenocarcinoma de mama	Aplidina	2,0E-09
		paclitaxel	> 1,0E-04
		doxorrubicina	2,9E-07
		cisplatino	7,0E-06
		trióxido de arsénico	1,0E-04
		5-FU	1,8E-05
		AraC	> 1,0E-04
		carboplatino	5,2E-05
		SN38	< 1,0E-11
MOLT3	Leucemia linfoblástica aguda	Aplidina	4,9E-14
		paclitaxel	7,7E-05
		doxorrubicina	6,9E-09
		cisplatino	5,7E-07
		trióxido de arsénico	3,7E-06
		5-FU	1,1E-05
		AraC	2,2E-07
		carboplatino	4,0E-06
		SN38	1,0E-06

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubó cada línea celular con Aplidina en combinación con cada uno de los agentes convencionales mencionados anteriormente en las siguientes combinaciones de concentraciones CI₅₀ únicas:

CI ₅₀ de Aplidina	CI ₅₀ de Agente Convencional
100 %	0 %
75 %	25 %
60 %	40 %

(continuación)

CI ₅₀ de Aplidina	CI ₅₀ de Agente Convencional
50 %	50 %
40 %	60 %
30 %	70 %
25 %	75 %
0 %	100 %
0 %	0 %

5 Las placas de microtitulación se incubaron durante 72 h, en 5 % de CO₂ y 37 °C. El efecto citotóxico se midió mediante el ensayo MTS. Las densidades ópticas se leyeron a 490 nm. Los datos normalizados se representaron e interpretaron tal y como se ha descrito. Los datos se analizaron como sigue:

1. Se usó el programa de software Prism (Graphpad®) para normalizar los datos con respecto a los valores de control (100 % = crecimiento celular en ausencia de agente (fármaco); 0 % = control blanco).

10 2. Los datos normalizados se representaron en forma de diagramas de puntos. Se trazó una línea uniendo los valores de 100 % de CI₅₀ para cada agente (fármaco). Los valores que estaban significativamente por encima de la línea indicaban antagonismo, por debajo indicaban sinergia, y en la línea indicaban aditividad.

15 El tratamiento estadístico de los datos se efectuó de acuerdo con Laska E. y col. *Biometrics* (1994) 50:834-841 y Greco y col. *Pharmacol Rev.* (1995) 47: 331-385. Las combinaciones en las proporciones de dosis ensayadas se consideraron que eran sinérgicas cuando la inhibición de la proliferación celular era mayor que los valores de inhibición máxima para cada fármaco por separado (a un 100 % de CI₅₀). A la inversa, se concluyó que había antagonismo cuando la inhibición era menor que ambos máximos. Se concluyó que había aditividad cuando los efectos de las combinaciones no diferían significativamente de los máximos para ambos fármacos. Se determinó la significancia estadística realizando un ensayo T de Student respecto a la inhibición para cada proporción de dosis frente a la inhibición para el máximo para cada fármaco. La significancia global de las combinaciones de fármacos para cada línea celular dependía de lo que muestra la significancia estadística para valores mayores del 50 % de las proporciones de dosis.

25 Como ayuda visual, se representaron los valores de respuesta en un diagrama de puntos con las proporciones de dosis en el eje x y los valores del % de respuesta en el eje y. Se trazó una línea horizontal entre los dos valores de respuesta de los extremos (por ejemplo, entre los valores de respuesta para un 100 % de CI₅₀ de la Aplidina y un 100 % de CI₅₀ del agente quimioterapéutico convencional). En los casos en los que los valores de respuesta en los dos puntos extremos eran aproximadamente equivalentes, los puntos que caían por encima o por debajo de esta línea prevista de aditividad se podían interpretar como representativos de una interacción de los fármacos antagonista o sinérgica, respectivamente.

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

De acuerdo con este ensayo se descubrió que:

35 a. La combinación de Aplidina con paclitaxel mostraba sinergia en células de adenocarcinoma de mama SKBR3 (Figura 2), en células de leucemia linfoblástica aguda MOLT3 (Figura 3) y en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 4). Se observó tendencia a la aditividad en células de leucemia promielocítica HL60 (Figura 5), en células de carcinoma de mama MX1 (Figura 6) y en células NSCL A549 (Figura 7).

40 b. La combinación de Aplidina con doxorubicina mostraba sinergia en células NSCL A549 (Figura 8), en células de adenocarcinoma de colon HT29 (Figura 9) y en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 10). Se observó aditividad en células de leucemia linfoblástica aguda MOLT3 (Figura 11), en células de carcinoma de mama MX1 (Figura 12) y en células de adenocarcinoma de mama SKBR3 (Figura 13).

45 c. La combinación de Aplidina con cisplatino mostraba sinergia en células de adenocarcinoma de mama MX1 (Figura 14) y en células de adenocarcinoma de colon HT29 (Figura 15). Se observó aditividad en células de adenocarcinoma de mama SKBR3 (Figura 16) y en células de leucemia linfoblástica aguda MOLT3 (Figura 17), y se descubrió una tendencia a la sinergia en células NSCL A549 (Figura 18).

d. La combinación de Aplidina con trióxido de arsénico mostraba sinergia en células NSCL A549 (Figura 19), en células de adenocarcinoma de colon HT29 (Figura 20) y en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 21). Se observó aditividad en células de leucemia linfoblástica aguda MOLT3 (Figura 22).

e. La combinación de Aplidina con 5-fluorouracilo mostraba sinergia en células de leucemia promielocítica HL60 (Figura 23), en células de adenocarcinoma de mama SKBR3 (Figura 24), en células NSCL A549 (Figura 25) y en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 26). Se observó aditividad en células de adenocarcinoma de colon HT29 (Figura 27).

5 f. La combinación de Aplidina con arabinósido de citosina mostraba sinergia en células de adenocarcinoma de mama SKBR3 (Figura 28), en células de NSCL mama A549 (Figura 29) y en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 30). Se descubrió aditividad en células de leucemia promielocítica HL60 (Figura 31) y en células de adenocarcinoma de colon HT29 (Figura 32).

10 g. La combinación de Aplidina con carboplatino mostraba sinergia en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 33) y en células de adenocarcinoma de colon HT29 (Figura 34). Se observó aditividad en células de NSCL A549 (Figura 35), en células de leucemia linfoblástica aguda MOLT3 (Figura 36) y en células de carcinoma de mama MX1 (Figura 37).

15 h. La combinación de Aplidina con SN38 mostraba sinergia en células NSCL A549 (Figura 38). Se observó aditividad en células de adenocarcinoma de mama SKBR3 (Figura 39), en células de leucemia promielocítica HL60 (Figura 40) y en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (Figura 41).

Ejemplo 2. Estudios *in vitro* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otro agente convencional sobre líneas de células tumorales de leucemia, linfoma, mieloma múltiple y melanoma.

20 Siguiendo el mismo procedimiento que el mostrado en el ejemplo 1, se evaluó la Aplidina, como agente único o en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales seleccionados, frente a diversas líneas de células tumorales para medir las diferencias en cuanto a toxicidad.

Se seleccionaron los siguientes agentes convencionales como agentes únicos y para su combinación con la Aplidina: etopósido (VP16) y carboplatino. Las líneas de células tumorales para este ensayo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Línea celular	Tipo de tumor
HL-60	Leucemia
K562	Leucemia
MOLT-3	Leucemia
H9	Linfoma
HUT78	Linfoma
MC116	Linfoma
RAMOS	Linfoma
U937	Linfoma
NCI-H929	Mieloma múltiple
HUNS-1	Mieloma múltiple
U266B-1	Mieloma múltiple
RPMI 8226	Mieloma múltiple
LOXIMVI	Melanoma
UACC-257	Melanoma

25

Procedimiento de cultivo celular

30 Todas las líneas de células se mantuvieron en sus respectivos medios de crecimiento a 37 °C, 5 % de CO₂ y 98 % de humedad. Ninguna de las formulaciones de los medios contenía antibióticos. El día anterior a la siembra de las células en las placas, se administró a todos los cultivos medio de crecimiento completo recién preparado. El día de la cosecha (en las placas), las células se contaron mediante el procedimiento de tinción de exclusión con azul de tripano.

Siembra de las células en placas

Las células se cosecharon y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a 15.000 células por pocillo en 190 µl de medio y se incubaron durante 24 horas para permitir que las células se agregaran antes de la adición del fármaco.

5 Tratamiento con fármaco

Se preparó una solución madre de Aplidina de 5 mg/ml en DMSO al 100 %. Se prepararon soluciones madre de los agentes quimioterapéuticos VP16 y carboplatino en DMSO al 100 % con una concentración de 2 mg/ml para ambos fármacos.

10 Las células se trataron con Aplidina y el otro fármaco convencional en el intervalo que se enumera a continuación y se prepararon concentraciones de los fármacos individuales por triplicado para cada placa. La concentración de los agentes ensayados usada se expresa como el porcentaje de la CI₅₀ del agente individual, que fue determinada en el Ejemplo 1.

CI ₅₀ de Aplidina	CI ₅₀ de Agente Convencional
100 %	0 %
75 %	25 %
60 %	40 %
50 %	50 %
40 %	60 %
30 %	70 %
25 %	75 %
0 %	100 %

Los valores de CI₅₀ individuales de cada agente para cada línea celular se muestran en la Tabla 4.

15

Tabla 4

Fármaco	Línea celular	CI ₅₀ (Molar)
Aplidina	HL-60	8,0E-12
	K562	2,0E-10
	MOLT-3	3,2E-14
	H9	4,8E-14
	HUT78	10E-15
	MC116	5,5E-10
	RAMOS	5,0E-09
	U937	4,4E-13
	U2668-1	5,9E-12
	RPMI 8226	1,4E-14
	HUNS-1	3,4E-14
	NCI-H929	5,2E-13
	LOXIMVI	3,5E-09
	UACC-257	4,8E-10
VP16	HL-60	2,0E-06
	K562	7,6E-06
	MOLT-3	2,4E-08
	H9	7,3E-07

(continuación)

Fármaco	Línea celular	CI ₅₀ (Molar)
	HUT78	1,4E-06
	MC116	2,3E-07
	RAMOS	1,1E-07
	U937	4,4E-07
	U2668-1	5,9E-06
	RPMI 8226	3,7E-07
	HUNS-1	3,1E-06
	NCI-H929	2,4E-06
	Carboplatino	LOXIMVI
UACC-257		1,7E-04

El efecto citotóxico se midió mediante el ensayo MTS (Tetrazolio), que es un procedimiento colorimétrico para determinar el número de células viables.

- 5 Después de 72 horas de incubación con los agentes ensayados, se añadieron 25 µl de solución MTS+PMS a cada pocillo de microtitulación y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Después, las placas se retiraron de la incubadora y se colocaron en un agitador de placa durante 5 minutos (cubiertas con papel de aluminio para protegerlas de la luz). Se leyeron las densidades ópticas a 490 nm en un espectrofotómetro lector de placas. Los datos se analizaron como sigue:
- 10 1. Se usó el programa de software Prism (Graphpad®) para normalizar los datos con respecto a los valores de control (100 % = crecimiento celular en ausencia de agente (fármaco); 0 % = control blanco).
2. Los datos normalizados se representaron en forma de diagramas de puntos. Se trazó una línea uniendo los valores de 100 % de CI₅₀ para cada agente (fármaco). Los valores que estaban significativamente por encima de la línea indicaban antagonismo, por debajo indicaban sinergia, y en la línea indicaban aditividad.
- 15 El tratamiento estadístico de los datos se efectuó de acuerdo con Laska E. y col. *Biometrics* (1994) 50:834-841 y Greco y col. *Pharmacol Rev.* (1995) 47: 331-385. Las combinaciones en las proporciones de dosis ensayadas se consideraron que eran sinérgicas cuando la inhibición de la proliferación celular era mayor que los valores de inhibición máxima para cada fármaco por separado (a un 100 % de CI₅₀). A la inversa, se concluyó que había antagonismo cuando la inhibición era menor que ambos máximos. Se concluyó que había aditividad cuando los efectos de las combinaciones no diferían significativamente de los máximos para ambos fármacos. Se determinó la significancia estadística realizando un ensayo T de Student respecto a la inhibición para cada proporción de dosis frente a la inhibición para el máximo para cada fármaco. La significancia global de las combinaciones de fármacos para cada línea celular dependía de lo que muestra la significancia estadística para valores mayores del 50 % de las proporciones de dosis.
- 25 Como ayuda visual, se representaron los valores de respuesta en un diagrama de puntos con las proporciones de dosis en el eje x y los valores del % de respuesta en el eje y. Se trazó una línea horizontal entre los dos valores de respuesta de los extremos (por ejemplo, entre los valores de respuesta para un 100 % de CI₅₀ de la Aplidina y un 100 % de CI₅₀ del agente quimioterapéutico convencional). En los casos en los que los valores de respuesta en los dos puntos extremos eran aproximadamente equivalentes, los puntos que caían por encima o por debajo de esta línea prevista de aditividad se podían interpretar como representativos de una interacción de los fármacos antagonista o sinérgica, respectivamente.
- 30 En las Figuras 42A y 42B se muestran los datos de la actividad *in vitro* de la Aplidina en combinación con VP16 frente a células HL-60. De acuerdo con estos datos se obtiene un efecto aditivo.
- 35 En las Figuras 43A y 43B se muestran los datos de la actividad *in vitro* de la Aplidina en combinación con VP16 frente a células K562. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad.
- En las Figuras 44A y 44B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células MOLT-3. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad.
- 40 En las Figuras 45A y 45B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células MC116. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad en esta línea de células tumorales.

En las Figuras 46A y 46B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células RAMOS. De acuerdo con estos datos se obtiene una sinergia en esta línea de células tumorales.

5 En las Figuras 47A y 47B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células U937. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad.

En las Figuras 48A y 48B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células NCI-H929. De acuerdo con estos datos se obtiene una sinergia.

10 En las Figuras 49A y 49B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células HUNS-1. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad en esta línea de células tumorales.

En las Figuras 50A y 50B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células U266B-1. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad en esta línea de células tumorales.

15 En las Figuras 51A y 51B se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con VP16 frente a células RPMI 8226. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad en esta línea de células tumorales.

En la Figura 52 se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con carboplatino frente a células LOX-I-MVI. De acuerdo con estos datos se obtiene una aditividad en esta línea de células tumorales.

20 En la Figura 53 se muestran los datos de la actividad *in vitro* observada con la Aplidina en combinación con carboplatino frente a células UACC-257. De acuerdo con estos datos se obtiene una sinergia en esta línea de células tumorales.

Ejemplo 3: Estudios *in vitro* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otros agentes convencionales sobre líneas de células tumorales de mieloma múltiple.

25 El mieloma múltiple (MM) es una enfermedad maligna de las células del plasma, originado generalmente a partir de un clon de células de plasma que proliferan y se acumulan en la médula ósea. Las características clinicopatológicas de los pacientes con mieloma incluyen la acumulación de proteína monoclonal en la sangre o la orina, lesiones óseas líticas, anemia y disfunción renal (Sirohi B. y col. *Lancet* (2004) 363: 875-87).

30 El tratamiento real del mieloma se basa en una terapia de alta dosis soportada por un trasplante de células madre. A pesar de los avances en la última década, hoy en día el MM sigue siendo una enfermedad incurable con una supervivencia global media para los pacientes de 2 a 5 años (Sirohi B. y col. *Lancet* (2004) 363: 875-87). Son necesarios nuevos enfoques del tratamiento a fin de mejorar las consecuencias en los pacientes, que siguen tres líneas principales de investigación: a) mejorar la eficacia de la quimioterapia mediante el uso de dosis altas; b) mejorar la respuesta inmune del huésped frente a las células de mieloma; y c) desarrollar nuevos fármacos con dianas más específicas que puedan interferir no sólo con las células de mieloma sino también con el microambiente de la médula ósea (San Miguel JF y col. *Curr. Treat. Options Oncol.* (2003) 4: 247-58). Se espera que la combinación de dos o más de estos agentes terapéuticos lleve a una eficacia anti-MM mejorada y a unas tasas de supervivencia más prolongadas.

40 Con el presente documento los autores informan de diversos estudios sobre el efecto de la Aplidina como nuevo fármaco en el tratamiento del mieloma múltiple. Estos estudios incluyen:

1) la eficacia citotóxica de la Aplidina (sola o en combinación) sobre diversas líneas celulares de MM usando los ensayos de viabilidad celular (ensayo MTT) y de apoptosis (tinción con anexina V).

2) la eficacia citotóxica de combinaciones de Aplidina y otros fármacos clásicos y recientemente desarrollados en el tratamiento de esta enfermedad.

45 Material y procedimientos

Líneas celulares y reactivos de cultivo celular

50 Se usaron cuatro líneas celulares derivadas de MM en este estudio: Las variantes sensible a la dexametasona (MM.1S) y resistente a la dexametasona (MM.1R) de la línea celular del mieloma múltiple humano MM.1 (Greenstein S. y col. *Exp. Hematol* (2003) 31:271-82) que fueron amablemente proporcionadas por el Dr. S Rudikoff, Bethesda MD; y las líneas celulares U266 y su equivalente resistente al melfalán U266 LR7 se obtuvieron a través del Dr. W. Dalton, Tampa, FL. Todas las líneas celulares del MM se crecieron en medio RPMI 1640 complementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado térmicamente, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y L-glutamina 2mM. Todos los reactivos y medios de cultivo celular se adquirieron en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA).

Ensayos de viabilidad celular

El análisis de la proliferación celular del MM se evaluó usando el ensayo colorimétrico del metiltiotetrazol (MTT; Sigma, St. Louis MO). Las líneas celulares de MM se sembraron con una densidad de 50000 células/200 µl de medio por pocillo en placas de 48 pocillos, y se trataron con una dosis de fármaco y un tiempo determinados. Dos horas antes de la finalización del tratamiento, se añadió una solución de MTT (5 mg/ml en PBS; normalmente un 10 % del volumen de cada pocillo) y la sal de tetrazolio fue reducida por las células metabólicamente activas para dar cristales coloreados de formazán. Tras la solubilización de estos cristales mediante la incubación durante la noche con un 10 % de solución SDS-HCl, se midió la absorbancia a 570 nm con corrección a 630 nm. Se analizaron cuatro pocillos para cada condición, y los resultados se presentan como la media ± DE de cuadruplicados de un experimento representativo que se repitió al menos tres veces.

Transferencia Western

Las células se recogieron y se lavaron con PBS, y se obtuvieron los lisados celulares totales tras la incubación en tampón de lisis enfriado con hielo (NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, 10 % de glicerol, 1 % de Nonidet P-40, Tris 20 mM (pH 7,0), pepstatina 1 µM, 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, ortovanadato de sodio 1 mM). Después las muestras se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 10 min y se resolvieron cantidades iguales de proteína en los sobrenadantes mediante SDS-PAGE al 6 % - 12,5 %. Las proteínas se transfirieron después sobre membranas de nitrocelulosa o PVDF, se bloquearon mediante incubación en un 5 % de leche en polvo desnatada en tampón PBST (0,05 % -Tween 20 en PBS) y se incubaron posteriormente con los anticuerpos específicos primarios de Cruz Technologies (los anticuerpos anti-p-c-jun, anti-p-Erk1/2 y anti-Erk5 fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA), mientras que el anti-p-p38 fue obtenido en Cell Signaling (Danvers, MA), y el anticuerpo anti-PARP en Becton Dickinson Biosciences (Bedford, MA)]. Tras una segunda incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios se desarrollaron inmunotransferencias mediante quimioluminiscencia potenciada (*Enhanced Chemiluminescence* o ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). La identificación de JNK y Erk5 activadas requería la inmunoprecipitación previa de lisados de proteínas con los correspondientes anticuerpos específicos y Proteína A-Sefarosa.

Análisis de isoblogramas

La interacción entre la Aplidina y otros agentes anti-MM se analizó usando el programa de software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO). Los datos del ensayo de viabilidad celular (MTT) se expresaron como la fracción de células afectadas por la dosis (Fa) en las células tratadas con fármaco en comparación con las células sin tratar (control). Este programa se basa en el procedimiento de Chou-Talalay (Chou TC y col. *Adv. Enzyme Regul.* (1984) 22: 27-55) de acuerdo con la siguiente ecuación $IC = (D) 1 / (Dx) 1 + (D) 1 (D)2 / (Dx) 1 (Dx)2$ en la que (D) 1 y (D)2 son las dosis de fármaco 1 y 2 que tienen el mismo efecto x cuando se usan por separado. Valores de IC inferiores a 1,0 indican sinergia, valores de CI \cong 1,0 indican un efecto aditivo, mientras que valores superiores a 1 corresponden a un efecto antagonista.

*Resultados**Respuesta a la dosis de Aplidina en líneas celulares derivadas de MM*

Los autores determinaron en primer lugar si la Aplidina afecta a la viabilidad celular usando el ensayo MTT en líneas celulares derivadas de MM tanto sensibles como resistentes a fármacos de terapia convencional. Como puede verse en la Figura 54, el tratamiento con Aplidina durante 48 h induce una disminución similar de la viabilidad celular de un modo dependiente de la dosis en todas las líneas celulares ensayadas. El cincuenta por ciento de disminución de células viables (CI₅₀) tras un tratamiento de 48 h estaba en el intervalo de 1-10 nM para las cuatro líneas celulares ensayadas.

La eficacia de la Aplidina se comparó también con otros fármacos clásicos (Melfalán, Dexametasona) y nuevos (Bortezomib) en el tratamiento del MM. La figura 55 muestra una potencia superior de la Aplidina en comparación con los otros fármacos cuando se ensayaron en dosis de 0,1-1 nM durante 48 h en la línea celular MM.1S; su efecto era similar al del Bortezomib a dosis máximas (10-100 nM).

Evaluación de la sinergia en combinaciones dobles de Aplidina

Puesto que la exposición continua a la quimioterapia del MM está asociada en muchos casos a un aumento de la toxicidad y al desarrollo de resistencia a fármacos *de novo*, los autores ensayaron si la combinación de concentraciones mínimamente tóxicas de Aplidina y otros fármacos afectaría a la viabilidad celular del MM. Específicamente, la Aplidina se combinó con fármacos clásicos en el tratamiento del MM (tales como Dexametasona o Melfalán), también con agentes anti-mieloma recientemente desarrollados (Bortezomib), y con fármacos que estarían dirigidos específicamente al microambiente de la médula ósea (lenalidomida (Revlimid®)).

También se llevaron a cabo experimentos a lo largo del tiempo los días 1, 2, 3 y 6 para los agentes terapéuticos mencionados a fin de determinar las dosis subóptimas apropiadas (del 10 % al 30 % de inhibición del crecimiento) para experimentos combinatorios así como para explorar la duración de los tratamientos. Los experimentos de

combinación de la Aplidina y el resto de los fármacos se efectuaron tras una incubación durante 3 días o 6 días. El crecimiento celular de la línea celular MM.1S se midió mediante el ensayo MTT tal y como se ha descrito anteriormente, y se analizaron los porcentajes de inhibición mediante el programa CalcuSyn. El índice de combinación (IC) calculado mediante ordenador se usó para juzgar los resultados de una combinación: IC > 1, IC = 1, y IC < 1 que indican efectos de antagonismo, aditividad y sinergia, respectivamente. La conformidad de los datos con el principio mediana-efecto se puede expresar fácilmente mediante el coeficiente de correlación lineal (r) del gráfico mediana-efecto: $\log(fa/fu) = m \log(D) - m \log(D_m)$, en el que D es la dosis, D_m es la dosis requerida para un 50 % del efecto, fa es la fracción afectada por la dosis, fu es la fracción no afectada, y m es el coeficiente de sigmoidicidad de la curva dosis-efecto. Para cada combinación doble se usó una combinación de proporción no constante. Cada experimento se repitió tres veces, y se efectuaron un mínimo de tres puntos de datos para cada fármaco individual y tres combinaciones.

Combinación de Aplidina con Dexametasona

El día 3 se observó una sinergia para combinaciones Aplidina 0,5 nM/Dexametasona 1 nM y 10 nM (Figura 56).

Tal y como se ilustra en la Figura 57, la combinación era más sinérgica el día 6.

15 Combinación de Aplidina con Melfalán

Las siguientes combinaciones mostraban efectos casi aditivos los días 3 y 6 (Figuras 58 y 59, respectivamente).

Combinación de Aplidina con Doxorubicina

El día 3, sólo una combinación era moderadamente sinérgica (Figura 60, combinación 1) y dos combinaciones eran aditivas (Figura 60, combinaciones 3 y 4).

20 El día 6 sólo dos combinaciones eran aditivas (Figura 61, combinaciones 7 y 8).

Combinación de Aplidina con lenalidomida (Revlimid®)

En el presente estudio, la combinación de Aplidina y lenalidomida (Revlimid®) mostraba un mayor grado de sinergia que las otras combinaciones examinadas (Figura 62).

Notablemente, la sinergia era más importante el día 6 (Figura 63).

25 Combinación de Aplidina con Bortezomib

Esta combinación mostraba antagonismo el día 3 (Figura 64); el día 6 se descubrió sinergia para dos combinaciones (figura 65, combinaciones 4 y 6).

Ejemplo 4: Estudios *in vivo* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otros agentes convencionales en xenoinjertos renales y de melanoma.

30 El fin de este estudio era evaluar la actividad antitumoral de la Aplidina cuando se administraba con un agente antitumoral convencional, ambos administrados usando una pauta de dosificación múltiple en diversos tipos de xenoinjertos tumorales en ratones hembra atímicos.

35 Los ratones hembra atímicos, desnudos, de 4-5 semanas de vida, se adquirieron en Harlan Sprague Dawley, Madison, Wisconsin. Los ratones se aclimataron al laboratorio durante al menos una semana antes de la implantación del tumor. Los animales se enjaularon en jaulas estáticas permitiéndoles el acceso a alimento y agua a voluntad. A los animales experimentales se les implantó bien fragmentos tumorales derivados de tumores humanos establecidos por trasplante o bien células obtenidas directamente de cultivos *in vitro*. Los tumores se implantaron por vía subcutánea en el costado derecho el Día 0.

40 Las mediciones del tamaño del tumor se registraron dos veces por semana comenzando el día 4 o 5 usando un calibrador Vernier. La fórmula para calcular el volumen de un elipsoide prolato se usó para evaluar el volumen del tumor a partir de mediciones bidimensionales del tumor: Volumen del tumor (mm³) = (longitud x anchura²) ÷ 2. Asumiendo la densidad unidad, el volumen se convirtió en peso (es decir, 1 mm³ = 1 mg). Cuando los tumores alcanzaron un intervalo de volumen aproximado de 100 ± 15 mg, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento y grupos de control. Los tratamientos se iniciaron y se administraron de acuerdo con el peso corporal individual. Se efectuó un estudio de determinación del intervalo de dosis en cada modelo de tumor a fin de

45 determinar el nivel de dosis apropiado de cada compuesto usado en los estudios de combinación.

Los siguientes agentes terapéuticos convencionales para los distintos tipos de cáncer (indicaciones) se combinaron con la Aplidina (APL) a fin de determinar si la terapia de combinación proporcionaría una mayor actividad antitumoral en comparación con la actividad combinada de los dos agentes administrados como monoterapias.

50

Indicación	Modelo de tumor	Compuestos
Melanoma	LOX-IMVI	APL + Carboplatino
		APL + Interleucina-2 (IL-2)
		APL + Interferón- α 2a (INF- α)
		APL + Dacarbazina (DTIC)
	MRI-H 187	APL + Carboplatino
		APL + Interleucina-2 (IL-2)
		APL + Interferón- α 2a (INF- α)
		APL + Dacarbazina (DTIC)
Renal	CaKi-1	APL + Interleucina-2 (IL-2)
		APL + Interferón- α 2a (INF- α)
		APL + Bevacizumab (Avastin®)
	MRI-H121	APL + Interleucina-2 (IL-2)
		APL + Interferón- α 2a (INF- α)
		APL + Bevacizumab (Avastin®)

Las tablas 5-10 muestran la cinética del volumen tumoral total (media \pm ETM, mg) tras el inicio del tratamiento con Aplidina, bien sola o bien en combinación con un agente terapéutico convencional, en xenoinjertos de tumor renal y de melanoma.

- 5 La Tabla 5 y las Figuras 66 y 67 muestran la cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (Aplidin®) como agente único o en combinación con DTIC y carboplatino en xenoinjertos tumorales de melanoma MRI-H187. Se administró la Aplidina diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección intraperitoneal (i.p.), el control salino (solución salina estéril) diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., la DTIC diariamente durante 5 días consecutivos mediante inyección i.p. y el carboplatino una dosis cada 4 días para un total de 4 tratamientos mediante inyección i.p.
- 10

Tabla 5

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total \pm ETM (mg)				
		DÍA 20	DÍA 24	DÍA 27	DÍA 31	DÍA 34
Control salino	-	139 \pm 13	221 \pm 41	292 \pm 47	420 \pm 71	571 \pm 111
Aplidina	50 μ g/kg	141 \pm 12	265 \pm 72	317 \pm 64	442 \pm 81	601 \pm 116
DTIC	40 mg/kg	148 \pm 14	264 \pm 60	377 \pm 98	558 \pm 152	681 \pm 187
Carboplatino	25 mg/kg	143 \pm 13	213 \pm 32	301 \pm 50	398 \pm 76	540 \pm 99

(continuación)

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total ± ETM (mg)				
		DÍA 20	DÍA 24	DÍA 27	DÍA 31	DÍA 34
Aplidina + DTIC	50 µg/kg + 40 mg/kg	145 ± 11	257 ± 51	311 ± 52	476 ± 114	632 ± 150
Aplidina + carboplatino	50 µg/kg + 25 mg/kg	145 ± 14	201 ± 46	262 ± 55	339 ± 76	443 ± 104

ETM = Error típico de la media

Tabla 5 (cont.)

Fármaco	Volumen tumoral total ± ETM (mg)					
	DÍA 38	DÍA 41	DÍA 46	DÍA 49	DÍA 52	DÍA 55
Control salino	702 ± 110	820 ± 141	1270 ± 233	1499 ± 247	1629 ± 277	1848 ± 313
Aplidina	813 ± 121	934 ± 156	1295 ± 241	1445 ± 211	1649 ± 249	1767 ± 239
DTIC	927 ± 274	1182 ± 324	1508 ± 427	1804 ± 507	2036 ± 525	2123 ± 558
Carboplatino	793 ± 132	917 ± 138	1303 ± 237	1447 ± 261	1603 ± 288	1989 ± 373
Aplidina + DTIC	723 ± 126	855 ± 133	1028 ± 193	1101 ± 197	1358 ± 300	1397 ± 265
Aplidina + carboplatino	608 ± 129	617 ± 146	622 ± 105	720 ± 148	796 ± 145	867 ± 164

Tabla 5 (cont.)

Fármaco	Volumen tumoral total ± ETM (mg)		
	DÍA 59	DÍA 62	DÍA 66
Control salino	2049 ± 357	2100 ± 330	2263 ± 375
Aplidina	2113 ± 329	2423 ± 408	2561 ± 441
DTIC	2166 ± 563	2333 ± 433	2508 ± 536
Carboplatino	2292 ± 487	2659 ± 492	2723 ± 519
Aplidina + DTIC	1585 ± 251	1571 ± 261	1879 ± 311
Aplidina + carboplatino	1070 ± 250	1153 ± 231	1430 ± 237

5 A partir de este estudio con xenoinjertos se concluyó que en las células de melanoma MRI-H187 la combinación de Aplidina con DTIC y la de Aplidina con carboplatino muestran una clara potenciación estadísticamente significativa de la actividad antitumoral, siendo más notable en el caso de la combinación con carboplatino.

10 La Tabla 6 y las Figuras 68 y 69 muestran la cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (Aplidin®) como agente único o en combinación con Interleucina-2 (IL-2) e Interferón-α 2a (INF-α) en xenoinjertos tumorales de melanoma MRI-H187. La Aplidina se administró diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el control salino (solución salina estéril) diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., la IL-2 diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección i.p. y el INF-α diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección subcutánea (s.c.).

Tabla 6

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total ± ETM (mg)				
		DÍA 21	DÍA 23	DÍA 27	DÍA 30	DÍA 34
Control salino	-	116 ± 4	172 ± 16	289 ± 28	367 ± 33	562 ± 39
Aplidina	50 µg/kg	114 ± 7	156 ± 15	262 ± 32	353 ± 34	573 ± 70
IL-2	2 µg/ratón	113 ± 4	171 ± 24	314 ± 46	420 ± 68	647 ± 88

(continuación)

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total \pm ETM (mg)				
		DÍA 21	DÍA 23	DÍA 27	DÍA 30	DÍA 34
INF- α	200.000 U/ratón	115 \pm 5	169 \pm 19	272 \pm 40	398 \pm 54	653 \pm 99
Aplidina + IL-2	50 μ g/kg + 2 μ g/ratón	113 \pm 4	206 \pm 19	307 \pm 42	399 \pm 51	673 \pm 80
Aplidina + INF- α	50 μ g/kg + 200.000 U/ratón	113 \pm 7	152 \pm 12	272 \pm 32	328 \pm 48	506 \pm 56

ETM = Error típico de la media

Tabla 6 (cont.)

Fármaco	Volumen tumoral total \pm ETM. (mg)				
	DÍA 37	DÍA 40	DÍA 42	DÍA 48	DÍA 51
Control salino	669 \pm 52	863 \pm 84	953 \pm 94	1495 \pm 211	1840 \pm 280
Aplidina	743 \pm 81	837 \pm 108	1000 \pm 147	1500 \pm 236	1836 \pm 260
IL-2	843 \pm 90	1072 \pm 136	1215 \pm 158	1672 \pm 166	2005 \pm 202
INF- α	776 \pm 115	912 \pm 149	1104 \pm 202	1521 \pm 311	1978 \pm 450
Aplidina + IL-2	872 \pm 93	1083 \pm 98	1299 \pm 107	1592 \pm 110	1739 \pm 108
Aplidina + INF- α	664 \pm 61	783 \pm 86	938 \pm 89	1276 \pm 170	1541 \pm 221

5 A partir de este estudio con xenoinjertos se concluyó que en las células de melanoma MRI-H187 la combinación de Aplidina con IL-2 y la de Aplidina con INF- α mostraban aditividad.

10 La Tabla 7 y las Figuras 70 y 71 muestran la cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como agente único o en combinación con DTIC y carboplatino en xenoinjertos tumorales de melanoma LOX-IMVI. La Aplidina se administró diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el control salino (solución salina estéril) diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p. la DTIC diariamente durante 5 días consecutivos mediante inyección i.p. y el carboplatino una dosis cada 4 días para un total

de 4 tratamientos mediante inyección i.p.

Tabla 7

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total ± ETM. (mg)				
Control salino	-	107 ± 4	292 ± 45	1356 ± 174	3085 ± 346	9364 ± 1702
Aplidina	50 µg/kg	107 ± 5	288 ± 21	863 ± 87	2261 ± 459	8980 ± 1085
DTIC	30 mg/kg	105 ± 5	208 ± 25	699 ± 57	950 ± 57	2695 ± 560
Carboplatino	25 mg/kg	107 ± 3	347 ± 43	1167 ± 117	2936 ± 543	4598 ± 1182
Aplidina + DTIC	50 µg/kg + 30 mg/kg	107 ± 4	302 ± 16	819 ± 57	1174 ± 129	3397 ± 745
Aplidina + Carboplatino	50 µg/kg + 25 mg/kg	107 ± 5	253 ± 30	909 ± 152	1911 ± 374	4000 ± 1610

ETM = Error típico de la media

5 A partir de este estudio con xenoinjertos se puede concluir que en las células de melanoma LOX-IMVI la combinación de Aplidina con DTIC muestra un patrón aditivo y la combinación de Aplidina con carboplatino muestra una tendencia a la sinergia.

10 La Tabla 8 y las Figuras 72 y 73 muestran la cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como agente único o en combinación con Interleucina-2 (IL-2) e Interferón-α 2a (INF-α) en xenoinjertos tumorales de melanoma LOX-IMVI. La Aplidina se administró diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el control salino (solución salina estéril) diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., la IL-2 diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección i.p. y el INF-α diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección s.c.

Tabla 8

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total ± ETM (mg)			
		DÍA 6	DÍA 9	DÍA 13	DÍA 16
Control salino	-	111 ± 4	532 ± 63	1666 ± 152	2684 ± 303
Aplidina	50 µg/kg	113 ± 4	300 ± 15	1258 ± 131	2436 ± 256
IL-2	2 µg/ratón	111 ± 5	357 ± 51	1541 ± 247	3315 ± 614
INF-α	200.000 U/ratón	110 ± 4	329 ± 39	1452 ± 252	2188 ± 465
Aplidina + IL-2	50 µg/kg + 2 µg/ratón	111 ± 3	358 ± 50	1485 ± 274	3097 ± 826
Aplidina + INF-α	50 µg/kg + 200.000 U/ratón	112 ± 4	260 ± 18	1152 ± 110	2607 ± 472

ETM = Error típico de la media

15 A partir de este estudio con xenoinjertos se concluyó que en las células de melanoma LOX-IMVI la combinación de Aplidina con IL-2 y la de Aplidina con INF-α muestran aditividad.

20 La Tabla 9 y las Figuras 74, 75 y 76 muestran la cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como agente único o en combinación con Bevacizumab (Avastin®), Interleucina-2 (IL-2) e Interferón-α 2a (INF-α) en xenoinjertos tumorales renales CaKi-1. La Aplidina se administró diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el control salino (solución salina estéril) diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el Bevacizumab (Avastin®) cada 3 días para un total de 4 tratamientos mediante inyección i.p., la IL-2 diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección i.p. y el INF-α diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección s.c.

Tabla 9

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total ± ETM (mg)				
		DÍA 13	DÍA 15	DÍA 19	DÍA 22	DÍA 26
Control salino	-	105 ± 3	157 ± 11	226 ± 18	305 ± 29	500 ± 69
Aplidina	50 µg/kg	103 ± 3	164 ± 12	208 ± 12	282 ± 26	406 ± 46
Avastin®	5,0 mg/kg	105 ± 3	162 ± 14	286 ± 49	398 ± 53	632 ± 79
IL-2	2 µg/ratón	103 ± 3	143 ± 15	224 ± 21	324 ± 25	484 ± 49
INF-α	200.000 U/ratón	105 ± 3	162 ± 14	239 ± 28	312 ± 43	496 ± 60
Aplidina + Avastin®	50 µg/kg + 5,0 mg/kg	106 ± 3	169 ± 15	238 ± 21	283 ± 25	383 ± 48
Aplidina + IL-2	50 µg/kg + 2 µg/ratón	105 ± 3	147 ± 21	175 ± 16	208 ± 34	320 ± 57

ETM = Error típico de la media

Tabla 9 (cont.)

Fármaco	Volumen tumoral total ± ETM (mg)					
	DÍA 29	DÍA 33	DÍA 36	DÍA 41	DÍA 47	DÍA 50
Control salino	639 ± 64	741 ± 69	897 ± 75	1149 ± 76	1595 ± 74	1939 ± 110
Aplidina	637 ± 68	800 ± 86	1035 ± 117	1371 ± 125	1855 ± 202	2173 ± 213
Avastin®	811 ± 90	985 ± 111	1251 ± 109	1654 ± 189	2170 ± 253	2842 ± 379
IL-2	623 ± 59	746 ± 77	956 ± 102	1206 ± 116	1684 ± 120	2403 ± 218
INF-α	613 ± 92	734 ± 99	867 ± 86	1125 ± 111	1473 ± 149	1777 ± 197

(continuación)

Fármaco	Volumen tumoral total \pm ETM (mg)					
	DÍA 29	DÍA 33	DÍA 36	DÍA 41	DÍA 47	DÍA 50
Aplidina + Avastin®	451 \pm 42	579 \pm 51	825 \pm 86	1014 \pm 77	1409 \pm 122	1834 \pm 174
Aplidina + IL-2	398 \pm 49	495 \pm 64	680 \pm 75	859 \pm 88	1138 \pm 106	1404 \pm 122
Aplidina + INF- α	470 \pm 39	591 \pm 56	821 \pm 115	1117 \pm 148	1699 \pm 240	2356 \pm 354

5 A partir de este estudio con xenoinjertos, se concluyó que en las células renales CaKi-1 la combinación de Aplidina con Avastin® y la de Aplidina con IL-2 muestran sinergia, siendo más notable en el caso de la combinación con IL-2. Por otro lado, la combinación de Aplidina con INF- α muestra un patrón aditivo.

10 La Tabla 10 y las Figuras 77, 78 y 79 muestran la cinética del volumen tumoral total tras el inicio del tratamiento con Aplidina (APL) como agente único o en combinación con Bevacizumab (Avastin®), Interleucina-2 (IL-2) e Interferón- α 2a (INF- α) en xenoinjertos tumorales renales MRI-H121. La Aplidina se administró diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el control salino (solución salina estéril) diariamente durante 9 días consecutivos mediante inyección i.p., el Bevacizumab (Avastin®) cada 3 días para un total de 4 tratamientos mediante inyección i.p., la IL-2 diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección i.p. y el INF- α diariamente durante 5 días a la semana (lunes-viernes) durante 3 semanas mediante inyección s.c.

Tabla 10

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total \pm ETM (mg)				
		DÍA 11	DÍA 14	DÍA 18	DÍA 19	DÍA 21
Control salino	-	112 \pm 6	180 \pm 15	253 \pm 27	266 \pm 33	384 \pm 52
Aplidina	25 μ g/kg	108 \pm 6	182 \pm 15	357 \pm 44	345 \pm 42	467 \pm 68
Avastin®	2,5 mg/kg	106 \pm 7	171 \pm 16	306 \pm 27	299 \pm 39	365 \pm 39
IL-2	1 μ g/ratón	108 \pm 5	201 \pm 29	402 \pm 60	366 \pm 56	475 \pm 87
INF- α	200.000 U/ratón	110 \pm 6	166 \pm 15	331 \pm 32	341 \pm 32	371 \pm 37

(continuación)

Fármaco	Dosis/día	Volumen tumoral total ± ETM (mg)				
		DÍA 11	DÍA 14	DÍA 18	DÍA 19	DÍA 21
Aplidina + Avastin®	25 µg/kg + 2,5 mg/kg	106 ± 7	140 ± 20	247 ± 39	241 ± 30	295 ± 39
Aplidina + IL-2	25 µg/kg + 1 µg/ratón	109 ± 5	149 ± 16	286 ± 33	336 ± 51	381 ± 79
Aplidina + INF-α	25 µg/kg + 200.000 U/ratón	111 ± 7	152 ± 23	254 ± 45	301 ± 42	343 ± 52

ETM = Error típico de la media

Tabla 10 (cont.)

Fármaco	Volumen tumoral total ± ETM (mg)					
	DÍA 26	DÍA 29	DÍA 32	DÍA 35	DÍA 39	DÍA 42
Control salino	628 ± 106	789 ± 105	880 ± 126	1104 ± 166	1512 ± 188	1549 ± 204
Aplidina	688 ± 108	898 ± 106	1161 ± 141	1206 ± 157	1622 ± 195	1660 ± 169
Avastin®	503 ± 57	678 ± 77	899 ± 93	898 ± 69	1240 ± 124	1383 ± 148
IL-2	737 ± 121	922 ± 163	1138 ± 205	1175 ± 192	1615 ± 273	1873 ± 310
INF-α	591 ± 69	704 ± 91	809 ± 96	898 ± 108	1457 ± 165	1747 ± 210
Aplidina + Avastin®	501 ± 53	-	784 ± 93	848 ± 110	1166 ± 145	1430 ± 155
Aplidina + IL-2	662 ± 136	817 ± 136	951 ± 167	1052 ± 161	1447 ± 199	1791 ± 272
Aplidina + INF-α	635 ± 83	868 ± 104	937 ± 125	1081 ± 155	1739 ± 181	1996 ± 167

A partir de este estudio con xenoinjertos se concluyó que en las células renales MRI-H121 las tres combinaciones muestran un patrón aditivo.

Ejemplo 5. Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* adicionales en células de mieloma múltiple (RPMI 8226 y U-226B1) para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con dos agentes quimioterapéuticos de tratamiento convencionales (Bortezomib y Melfalán).

La Aplidina como agente único o en combinación con Bortezomib o bien con Melfalán se evaluaron frente a líneas celulares de mieloma múltiple, específicamente las líneas celulares RPMI 8226 y U226B1.

Estas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI1640 con FBS al 10 % y L-Glutamina al 1 %. Cada línea celular se sembró en placas de 96 pocillos a 20.000 células por pocillo.

En primer lugar, se ensayaron la Aplidina, el Bortezomib y el Melfalán por separado para determinar el valor de CI_{50} para cada uno de ellos individualmente. Para determinar el valor de CI_{50} , cada fármaco se revisó en un diferente intervalo de concentración de fármaco, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La Tabla 11 muestra el valor del CI_{50} individual obtenido con cada uno de los tres fármacos frente a dos líneas celulares de mieloma múltiple.

Tabla 11

	CI_{50} (Molar)	
	RPMI8226	U2661
Aplidina	2,93E-08	1,39E-09
Bortezomib	2,29E-09	1,66E-05
Melfalán	1,61E-05	3,16E-09

En la etapa siguiente, bien el Bortezomib o bien el Melfalán se combinaron con la Aplidina. En estos experimentos, se usaron concentraciones de Aplidina con una dilución en serie 1:10. Cada dilución en serie se emparejó con 4 concentraciones diferentes de Bortezomib o Melfalán.

Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C y 5 % de CO_2 . Las placas se leyeron usando un sistema de ensayo Promega MTS en el que el MTS fue metabolizado por las células vivas transformándolo en formazán, que es fluorescente a una longitud de onda de 490 nm. Esto es una medida indirecta de la viabilidad celular. Estas se analizaron usando el programa Softmax Pro® que determina la viabilidad celular basada en el porcentaje de los pocillos de control. Los datos de CI_{50} se transfirieron después a un programa CalcuSyn para el análisis del índice de combinación. El programa CalcuSyn compara los valores de CI_{50} de los fármacos individuales con los de los fármacos en combinación usando un algoritmo para determinar el índice de combinación. Es importante señalar que el índice de combinación (IC) es un reflejo del efecto de combinación de los dos fármacos. $CI = 1$ indica un efecto aditivo; $CI < 1$ indica un efecto sinérgico; y $CI > 1$ indica un efecto antagonista.

La Tabla 12 recoge aquellas dosis con las que se observó un efecto sinérgico en la combinación de Aplidina con Bortezomib frente a la línea celular RPMI 8226:

Tabla 12

Concentración de Aplidina	Concentración de Bortezomib	IC
0,2 μ /ml	1,0 ng/ml	0,402
	3,5 ng/ml	0,911
	6,0 ng/ml	0,013
	8,5 ng/ml	0,014
2 μ g/ml	1,0 ng/ml	0,103
	3,5 ng/ml	0,104
	6,0 ng/ml	0,106
	8,5 ng/ml	0,107

La Tabla 13 recoge aquellas dosis con las que se observó un efecto sinérgico en la combinación de Aplidina con Melfalán frente a la línea celular RMPI 8226:

Tabla 13

Concentración de Aplidina	Concentración de Melfalán	IC
0,2 µg/ml	50 ng/ml	0,01
	30 ng/ml	0,01
	10 ng/ml	0,01
	8 ng/ml	0,01
2 µg/ml	50 ng/ml	0,103
	30 ng/ml	0,103
	10 ng/ml	0,103
	8 ng/ml	0,103

5 La Tabla 14 recoge aquellas dosis con las que se observó un efecto sinérgico en la combinación de Aplidina con Bortezomib frente a la línea celular U266B 1:

Tabla 14

Concentración de Aplidina	Concentración de Bortezomib	IC
0,2 pg/ml	3,5 ng/ml	0,602
	8,5 ng/ml	0,919
20 pg/ml	6,0 ng/ml	0,758
0,2 ng/ml	6,0 ng/ml	0,852
2 ng/ml	3,5 ng/ml	0,588
	6,0 ng/ml	0,776
	8,5 ng/ml	0,553
20 ng/ml	3,5 ng/ml	0,892
	8,5 ng/ml	0,79
0,2 µg/ml	1,0 ng/ml	0,317
	3,5 ng/ml	0,193
	6,0 ng/ml	0,251
	8,5 ng/ml	0,112

10 La Tabla 15 recoge aquellas dosis con las que se observó un efecto sinérgico en la combinación de Aplidina con Melfalán frente a la línea celular U266B1:

Tabla 15

Concentración de Aplidina	Concentración de Melfalán	IC
0,2 pg/ml	30 ng/ml	0,922
	10 ng/ml	0,064
	8 ng/ml	0,047

(continuación)

Concentración de Aplidina	Concentración de Melfalán	IC
2,0 pg/ml	50 ng/ml	0,525
	30 ng/ml	0,709
	10 ng/ml	0,164
	8 ng/ml	0,127
20 pg/ml	50 ng/ml	0,793
	10 ng/ml	0,467
	8 ng/ml	0,845
0,2 ng/ml	10 ng/ml	0,472
	8 ng/ml	0,974
2 ng/ml	50 ng/ml	0,744
	30 ng/ml	0,504
	10 ng/ml	0,498
	8 ng/ml	0,438
20 ng/ml	50 ng/ml	0,888
	30 ng/ml	0,688
	10 ng/ml	0,573
	8 ng/ml	0,573
0,2 µg/ml	50 ng/ml	0,249
	30 ng/ml	0,109
	10 ng/ml	0,145
	8 ng/ml	0,108

5 **Ejemplo 6.** Se llevaron a cabo ensayos *in vitro* adicionales en líneas celulares de leucemia (MOLT4 y K-562) para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con un agente quimioterapéutico de tratamiento convencional tal como la Idarrubicina.

Se evaluó la Aplidina, como agente único o en combinación con Idarrubicina, frente a líneas celulares de leucemia, específicamente las líneas celulares MOLT4 y K562.

Estas líneas celulares se cultivaron en medio RPMI1640 con FBS al 10 % y L-Glutamina 2 mM. Cada línea celular se sembró en placas de 96 pocillos a 20.000 células por pocillo.

10 En primer lugar, se ensayaron la Aplidina, y la Idarrubicina por separado para determinar el valor de CI_{50} para cada uno de ellos individualmente. Para determinar el valor de CI_{50} , cada fármaco se revisó en un diferente intervalo de concentración de fármaco, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. La Tabla 16 muestra el valor del CI_{50} individual obtenido con cada uno de los dos fármacos frente a las dos líneas celulares de leucemia.

Tabla 16

	CI_{50} (Molar)	
	MOLT4	K562
Aplidina	1,43E-08	2,35E-09
Idarrubicina	5,0E-11	6,33E-08

15

5 En la siguiente etapa se combinó Idarrubicina con Aplidina. En el experimento relacionado con la línea celular MOLT4 se usaron concentraciones de Aplidina con una dilución en serie 1:10. Cada dilución en serie se emparejó con 4 concentraciones diferentes de Idarrubicina. En el experimento relacionado con la línea celular K562, se usaron concentraciones de Aplidina con una dilución en serie 1:5, y la concentración de Idarrubicina se añadió a cada grupo de combinaciones basada en una proporción. Por tanto, la combinación A era 1:1, la combinación B era 0,008:1, la combinación C era 6,4E-05:1 y la combinación D era 5,12E-07:1.

10 Las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C y 5 % de CO₂. Las placas se leyeron usando un sistema de ensayo Promega MTS en el que el MTS fue metabolizado por las células vivas transformándolo en formazán, que es fluorescente a una longitud de onda de 490 nm. Esto es una medida indirecta de la viabilidad celular. Estas se analizaron usando el programa Softmax Prog® que determina la viabilidad celular basada en el porcentaje de los pocillos de control. Los datos de CI₅₀ se transfirieron después a un programa CalcuSyn para el análisis del índice de combinación. El programa CalcuSyn compara los valores de CI₅₀ de los fármacos individuales con los de los fármacos en combinación usando un algoritmo para determinar el índice de combinación. Es importante señalar que el índice de combinación (IC) es un reflejo del efecto de combinación de los dos fármacos. CI = 1 indica un efecto aditivo; CI < 1 indica un efecto sinérgico; y CI > 1 indica un efecto antagonista.

15 La Tabla 17 recoge aquellas dosis con las que se observó un efecto sinérgico en la combinación de Aplidina con Idarrubicina frente a la línea celular MOLT4:

Tabla 17

Concentración de Aplidina	Concentración de Idarrubicina	IC
0,2 µg/ml	3,0 ng/ml	0,28
	0,7 ng/ml	0,052
	8,0 pg/ml	0,053
2 µg/ml	3,0 ng/ml	0,669
	0,7 ng/ml	0,269
	8,0 pg/ml	0,337

20 La Tabla 18 recoge aquellas dosis con las que se observó un efecto sinérgico en la combinación de Aplidina con Idarrubicina frente a la línea celular K562:

Tabla 18

Concentración de Aplidina	Concentración de Idarrubicina	IC
Proporción Combinación 1:1		
6,4 ng/ml	6,4 ng/ml	0,054
32 ng/ml	32 ng/ml	0,051
160 ng/ml	160 ng/ml	0,003
0,8 µg/ml	0,8 µg/ml	0,014
4 µg/ml	4 µg/ml	0,222
Proporción Combinación 0,008:1		
256 pg/ml	32 ng/ml	0,687
1,28 ng/ml	160 ng/ml	0,025
6,4 ng/ml	0,8 µg/ml	0,026
32 ng/ml	4 µg/ml	0,209

(continuación)

Concentración de Aplidina	Concentración de Idarrubicina	IC
Proporción Combinación 6,4E-05:1		
10,2 pg/ml	160 ng/ml	0,194
51,2 pg/ml	0,8 µg/ml	0,677
256 pg/ml	4 µg/ml	0,459
Proporción Combinación 5,12E-07:1		
81,9 fg/ml	160 ng/ml	0,091
0,41 pg/ml	0,8 µg/ml	0,365
2,05 pg/ml	4 µg/ml	0,459

Ejemplo 7: Estudios *in vivo* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otro agente convencional en xenoinjertos de melanoma.

- 5 El fin de este estudio era evaluar la eficacia antitumoral de la Aplidina cuando se administraba en combinación con carboplatino frente a células de melanoma humano UACC-257 implantadas por vía subcutánea en ratones hembra atímicos NCr-*nu/nu*.

10 Los animales se enjaularon en jaulas microaislantes, hasta cinco por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana antes del experimento, ratones hembra atímicos, NCr-*nu/nu* de seis semanas de vida, se aclimataron en el laboratorio.

15 Cada ratón se inoculó por vía subcutánea cerca del costado derecho con células de melanoma humano UACC-257 procedentes de un cultivo celular *in vitro* usando una aguja de calibre 23. Cada ratón recibió 2×10^7 células resuspendidas en 0,2 ml de Matrigel®. Se descongeló un vial de células de melanoma humano UACC-257 congeladas y se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía baja glucosa (2.000 mg/l), bicarbonato sódico (1.500 mg/ml), L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino al 10 % (medio completo), y se crecieron en una incubadora a +37 °C en atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ hasta que se obtuvo el número necesario de células para la inoculación de los ratones. Las células se cosecharon tras cuatro pases en el cultivo. Las células se retiraron de los frascos, se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada. Los sedimentos de células se resuspendieron en medio completo recién preparado. Se determinaron el recuento de células y la viabilidad con un contador de células y analizador de viabilidad Beckman Coulter VI CELL XR. La suspensión de células se centrifugó, y el sedimento de células se resuspendió en Matrigel® con una densidad de células de $1,0 \times 10^8$ células/ml y se colocó sobre hielo húmedo. La concentración final de Matrigel® en la suspensión celular fue del 56,9 %. El día de la cosecha de células la viabilidad celular fue del 98,9 %.

25 El día de la inoculación de las células tumorales se designó como Día 0. Los tumores individuales crecieron hasta 150-245 mg de peso (150-245 mm³ de tamaño) el día de inicio del tratamiento, el Día 13 tras la inoculación de las células tumorales. Se asignaron cuarenta animales con tumores en el intervalo de tamaño apropiado a cuatro grupos de tratamiento de modo que las medianas de los pesos de los tumores el primer día de tratamiento fueran lo más aproximadas entre sí.

30 El experimento consistía en un grupo de control tratado con vehículo de 10 ratones y tres grupos tratados con fármaco de 10 ratones por grupo para un total de 40 ratones el primer día de tratamiento, el Día 13 tras la inoculación de las células tumorales. Los animales del Grupo 1 fueron tratados i.p. diariamente durante 9 días consecutivos (Días 13-21) con un vehículo de Aplidina diluido con solución salina. La Aplidina se administró i.p. diariamente durante 9 días (Días 13-21) con una dosificación de 60 µg/kg/dosis sola (Grupo 2) o en combinación con Carboplatino (Grupo 4). El Carboplatino se administró i.v. cada 4 días para un total de tres tratamientos (Días 13, 17 y 21) con una dosificación de 50 mg/kg/dosis solo (Grupo 3) o en combinación con Aplidina (Grupo 4). Los días en que se administraron ambos compuestos en el Grupo 4, la Aplidina se inyectó primero a los diez animales del grupo, seguido inmediatamente de la administración del Carboplatino (Grupo 4).

40 El Grupo 1 se trató i.p. con 0,18 % de Cremofor EL/0,18 % de etanol/0,84 % de WFI (agua para inyección)/98,8 % de solución salina (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal). La Aplidina se reconstituyó con un vehículo que contenía 15 % de Cremofor EL/15 % de etanol /70 % de WFI y solución salina diluida (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal). El Carboplatino se preparó en WFI (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal).

Los animales se observaron diariamente y se anotaron los signos clínicos. Se midieron los tumores s.c. y se pesaron los animales dos veces por semana empezando el primer día de tratamiento, el Día 13. El volumen del tumor se determinó mediante mediciones con un calibrador (mm) y usando la fórmula para una esfera elipsoide:

$$L \times W^2 / 2 = \text{mm}^3,$$

5 en la que L y W se refieren a las dimensiones perpendiculares mayor y menor recogidas en cada medición. Esta fórmula se usó también para calcular el peso del tumor, asumiendo la densidad unidad ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$).

10 La comparación de la mediana de los pesos tumorales en los grupos de tratamiento (T) respecto a la mediana de los pesos tumorales del grupo de control (T/C x 100 %) el Día 23 (dos días después de la finalización del tratamiento) y el Día 70 (el día de finalización del estudio) se usaron para la evaluación de la eficacia antitumoral. El % T/C para cada tratamiento se da en la Tabla 19.

Tabla 19

Grupo n.º	Agente	Dosificación & Unidad	Vía	Pauta	% T/C el día	
					23	70
1	Vehículo	0 µg/kg/dosis	IP	q1d X 9		
2	Aplidina	60 µg/kg/dosis	IP	q1d X 9	90	91
3	Carboplatino	50 mg/kg/dosis	IV	q4d X 3	95	60
4	Aplidina/ Carboplatino	60 µg/kg/dosis/ 50 mg/kg/dosis	IP	q1d X 9	95	53
			IV	q4d X 3		

Pauta vehículo: q1d x 9 día 13

Pauta Aplidina: q1d x 9 día 13

Pauta Carboplatino: q4d x 3 día 13

Pauta Aplidina/Carboplatino: q1d x 9 día 13/ q4d x 3 día 13

El tratamiento de combinación de Aplidina más Carboplatino fue tolerado sin muertes. El tratamiento de combinación dio como resultado valores T/C del 95 % y del 53 % los Días 23 y 70, respectivamente.

15 **Ejemplo 8:** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otro agente convencional en xenoinjertos de mieloma.

El fin de este estudio era evaluar la eficacia antitumoral de la Aplidina cuando se administraba en combinación con Bortezomib frente a células de mieloma humano RPMI 8226 implantadas por vía subcutánea en ratones macho SCID.

20 Los animales se enjaularon en jaulas microaislantes, hasta cinco por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana antes del experimento, ratones macho SCID de seis semanas de vida, se aclimataron en el laboratorio.

25 Cada ratón se inoculó por vía s.c. cerca del costado derecho con células de mieloma humano RPMI 8226 procedentes de un cultivo celular *in vitro* usando una aguja de calibre 23. Cada ratón recibió 2×10^7 células resuspendidas en 0,2 ml de Matrigel®. Las células de mieloma humano RPMI 8226 se adquirieron originalmente en la ATCC (número ATCC: CCL-155). Se descongeló un vial de células congeladas y se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía alta glucosa (4.500 mg/l), bicarbonato sódico (1.500 mg/ml), L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, piruvato sódico 1 mM y suero fetal bovino al 10 % (medio completo), y se crecieron en una incubadora a +37 °C en atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ hasta que se obtuvo el número necesario de células para la inoculación de los ratones. Las células se cosecharon tras cuatro pases en el cultivo. Las células se retiraron de los frascos, se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada. Los sedimentos de células se resuspendieron en medio completo recién preparado. Se determinaron el recuento de células y la viabilidad con un contador de células y analizador de viabilidad Beckman Coulter VI CELL XR. La suspensión de células se centrifugó de nuevo, y el sedimento de células se resuspendió en Matrigel® con una densidad de células de $1,0 \times 10^8$ células/ml y se colocó sobre hielo húmedo. La concentración final de Matrigel® en la suspensión celular fue del 78,3 %. El día de la cosecha de células la viabilidad celular fue del 89,3 %.

35 El día de la inoculación de las células tumorales se designó como Día 0. Los tumores individuales crecieron hasta 75-188 mg de peso (75-188 mm³ de tamaño) el día de inicio del tratamiento, el Día 18 tras la inoculación de las células tumorales. Se asignaron aquellos animales seleccionados con tumores en el intervalo de tamaño apropiado a cuatro grupos de tratamiento de modo que las medianas de los pesos de los tumores el primer día de tratamiento

fueran lo más aproximadas entre sí.

El experimento consistía en un grupo de control tratado con vehículo de 10 ratones y tres grupos tratados con fármaco de 10 ratones por grupo para un total de 40 ratones el primer día de tratamiento, el Día 18 tras la inoculación de las células tumorales. Los animales del Grupo 1 fueron tratados i.p. durante dos rondas diariamente durante 9 días consecutivos (Días 18-26 y Días 38-46) con un vehículo diluido con solución salina. La Aplidina se administró i.p. durante dos rondas diariamente durante 9 días consecutivos (Días 18-26 y Días 38-46) con una dosificación de 60 µg/kg/dosis sola (Grupo 2) o en combinación con Bortezomib (grupo 4). El Bortezomib se administró i.v. con una dosificación de 0,35 mg/kg/dosis durante cuatro semanas cada 3 días para un total de 2 tratamientos que comenzaron el Día 18, seguido de una inyección i.v. administrada el Día 46 solo (Grupo 3) o en combinación con Aplidina (Grupo 4). Los días en que se administraron ambos compuestos en el Grupo 4, la Aplidina se inyectó primero a los diez animales del grupo, seguido inmediatamente de la administración del Bortezomib (Grupo 4).

El Grupo 1 se trató i.p. con 0,18 % de Cremofor EL/0,18 % de etanol /0,84 % de WFI/98,8 % de solución salina (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal). La Aplidina se reconstituyó con un vehículo que contenía 15 % de Cremofor EL/15 % de etanol /70 % de WFI y solución salina diluida (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal). Se preparó Velcade® (Bortezomib) en solución salina (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal).

Los animales se observaron diariamente y se anotaron los signos clínicos. Se midieron los tumores s.c. y se pesaron los animales dos veces por semana empezando el primer día de tratamiento, el Día 18 tras la inoculación de las células tumorales. El volumen del tumor se determinó mediante mediciones con un calibrador (mm) y usando la fórmula para una esfera elipsoide tal y como se describe en el Ejemplo 7.

La comparación de la mediana de los pesos tumorales en los grupos de tratamiento (T) respecto a la mediana de los pesos tumorales del grupo de control (T/C x 100 %) el Día 27 (un día después de la finalización de la primera ronda del tratamiento con Aplidina) y el Día 48 (dos días después de la finalización del tratamiento con Aplidina y Bortezomib) se usaron para la evaluación de la eficacia antitumoral. El % T/C para cada tratamiento se da en la Tabla 20.

Tabla 20

Grupo n.º	Agente	Dosificación & Unidad	Vía	% T/C el día	
				27	48
1	Vehículo	0 µg/kg/dosis	IP		
2	Aplidina	60 µg/kg/dosis	IP	76	63
3	Bortezomib	0,35 mg/kg/dosis	IV	70	67
4	Aplidina/ Bortezomib	60 µg/kg/dosis/ 0,35 mg/kg/dosis	IP	49	31
			IV		
Pauta vehículo: q1d x 9 día 18, 38 Pauta Aplidina: q1d x 9 día 18, 38 Pauta Bortezomib: q3d x 2 día 18, 25, 32, 39; q1d x 1 día 46 Pauta Aplidina/Bortezomib: q1d x 9 día 18, 38/ q3d x 2 día 18, 25, 32, 39; q1d x 1 día 46					

El tratamiento de combinación de Aplidina más Bortezomib fue tolerado sin muertes. El tratamiento de combinación fue eficaz en la inhibición del crecimiento de las células de mieloma RPMI 8226, dando como resultado valores T/C del 49 % y del 31 % los Días 27 y 48, respectivamente. La actividad antitumoral del tratamiento de combinación fue mayor que la aditiva en comparación con la actividad antitumoral producida por la administración de cada compuesto solo.

Ejemplo 9: Estudios *in vivo* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otro agente convencional en xenoinjertos de linfoma.

El fin de este estudio era evaluar la eficacia antitumoral de la Aplidina cuando se administraba en combinación con Rituximab frente a células de linfoma humano RL implantadas por vía subcutánea en ratones hembra SCID.

Los animales se enjaularon en jaulas microaislantes, hasta cinco por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Durante una semana antes del experimento, ratones macho SCID de seis semanas de vida, se aclimataron en el laboratorio.

- Cada ratón se inoculó por vía s.c. cerca del costado derecho con células de linfoma humano RL procedentes de un cultivo celular *in vitro* usando una aguja de calibre 23. Cada ratón recibió $1,0 \times 10^7$ células resuspendidas en 0,2 ml de Matrigel®. Se descongeló un vial de células congeladas y se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía alta glucosa (4.500 mg/l), bicarbonato sódico (1.500 mg/ml), L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, piruvato sódico 1 mM y suero fetal bovino al 10 % (medio completo), y se crecieron en una incubadora a +37 °C en atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ hasta que se obtuvo el número necesario de células para la inoculación de los ratones. Las células se cosecharon tras seis pases en el cultivo. Las células se retiraron de los frascos, se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada. Los sedimentos de células se resuspendieron en medio completo recién preparado. Se determinó el recuento de células con un contador de células Coulter Modelo Z1 y la viabilidad se midió tras la tinción con yoduro de propidio y se analizó usando un citómetro de flujo Beckman Coulter EPICS XL. La suspensión de células se centrifugó de nuevo, y el sedimento de células se resuspendió en Matrigel® con una densidad de células de $5,0 \times 10^7$ células/ml y se colocó sobre hielo húmedo. La concentración final de Matrigel® en la suspensión celular fue del 73,0 %. El día de la cosecha de células la viabilidad celular fue del 98,9 %.
- El día de la inoculación de las células tumorales se designó como Día 0. Los tumores individuales crecieron hasta 100-196 mg de peso (100-196 mm³ de tamaño) el día de inicio del tratamiento, el Día 15 tras la inoculación de las células tumorales. Se asignaron cuarenta animales con tumores en el intervalo de tamaño apropiado a cuatro grupos de tratamiento de modo que las medianas de los pesos de los tumores en todos los grupos el primer día de tratamiento fueran lo más aproximadas entre sí.
- El experimento consistía en un grupo de control tratado con vehículo de 10 ratones y tres grupos tratados con fármaco de 10 ratones por grupo para un total de 40 ratones el primer día de tratamiento, el Día 15 tras la inoculación de las células tumorales. Los animales del Grupo 1 fueron tratados i.p. durante dos rondas diariamente durante 9 días consecutivos (Días 15-23 y Días 28-36) con un vehículo de Aplidina diluido con solución salina. Las Aplidina se administró i.p. durante dos rondas diariamente durante 9 días consecutivos (Días 15-23 y Días 28-36) con una dosificación de 60 µg/kg/dosis sola (Grupo 2) o en combinación con Rituximab (Grupo 4). El Rituximab se administró i.p. con una dosificación de 20 mg/kg/dosis durante cuatro rondas semanales de tratamiento cada 3 días para un total de 2 tratamientos (pauta q3d x 2) empezando el Día 15 solo (Grupo 3) o en combinación con Aplidina (Grupo 4). Los días en que se administraron ambos compuestos en el Grupo 4, la Aplidina se inyectó primero a los diez animales del grupo, seguido inmediatamente de la administración del Rituximab (Grupo 4).
- El Grupo 1 se trató i.p. con 0,18 % de Cremofor EL/0,18 % de etanol /0,84 % de WFI/98,8 % de solución salina (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal). La Aplidina se reconstituyó con un vehículo que contenía 15 % de Cremofor EL/15 % de etanol /70 % de WFI y solución salina diluida (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal). Se preparó Rituxan® (Rituximab) en solución salina (volumen de inyección: 0,1 ml/10 g de peso corporal).
- Los animales se observaron diariamente y se anotaron los signos clínicos. Se midieron los tumores s.c. y se pesaron los animales dos veces por semana empezando el primer día de tratamiento, el Día 15. El volumen del tumor se determinó mediante mediciones con un calibrador (mm) y usando la fórmula para una esfera elipsoide tal y como se describe en el Ejemplo 7.
- La comparación de la mediana de los pesos tumorales en los grupos de tratamiento (T) respecto a la mediana de los pesos tumorales del grupo de control (T/C x 100 %) el Día 24 (un día después de la finalización de la primera ronda de 9 días del tratamiento con Aplidina) y el Día 38 (dos días después de la finalización de la segunda ronda de 9 días de tratamiento con Aplidina) se usaron para la evaluación de la eficacia antitumoral. El % T/C para cada tratamiento se da en la Tabla 21.

Tabla 21

Grupo n.º	Agente	Dosificación & Unidad	Vía	% T/C el día	
				24	38
1	Vehículo	0 µg/kg/dosis	IP		
2	Aplidina	60 µg/kg/dosis	IP	84	84
3	Rituximab	20 mg/kg/dosis	IP	95	102
4	Aplidina/ Rituximab	60 µg/kg/dosis/ 20 mg/kg/dosis	IP	69	74
			IP		
Pauta vehículo: q1d x 9 día 15, 28 Pauta Aplidina: q1d x 9 día 15, 28 Pauta Rituximab: q3d x 2 día 15, 22, 29, 36 Pauta Aplidina/Rituximab: q1d x 9 día 15, 28/ q3d x 2 día 15, 22, 29, 36					

El tratamiento de combinación de Aplidina más Rituximab fue tolerado sin muertes. El tratamiento de combinación fue eficaz en la inhibición del crecimiento de las células de linfoma RL dando como resultado valores T/C del 69 % y del 74 % los Días 24 y 38, respectivamente. Por tanto, cuando la Aplidina se combina con Rituximab se observó una potenciación de la actividad antitumoral.

- 5 **Ejemplo 10:** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de la Aplidina en combinación con otros agentes convencionales (combinaciones triples) sobre líneas de células tumorales de mieloma múltiple.

En el presente estudio se analizaron combinaciones triples de agentes antitumorales. Todas las combinaciones se ensayaron usando el ensayo de viabilidad celular (MMT) en una línea celular MM.1S, una línea celular de MM muy sensible. Los resultados se analizaron usando el programa de software Calcsyn.

10 *Líneas celulares y reactivos de cultivo celular*

La línea celular de MM sensible a la dexametasona MM.1S fue amablemente proporcionada por el Dr. S Rudikoff, Bethesda MD). La línea celular se creció en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 10 % inactivado térmicamente, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y L-glutamina 2 mM. Todos los reactivos y medios de cultivo celular se adquirieron en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA).

15 *Ensayos de viabilidad celular*

- El análisis de la proliferación celular del MM se evaluó usando el ensayo colorimétrico del metiltetrazolol (MTT; Sigma, St. Louis MO). Las líneas celulares de MM se sembraron con una densidad de 50.000 células/200 µl de medio por pocillo en placas de 48 pocillos, y se trataron con una dosis de fármaco y un tiempo determinados. Dos horas antes de la finalización del tratamiento, se añadió una solución de MTT (5 mg/ml en PBS; normalmente un 10 % del volumen de cada pocillo) y la sal de tetrazolol fue reducida por las células metabólicamente activas para dar cristales coloreados de formazán. Tras la solubilización de estos cristales mediante incubación durante la noche con un 10 % de solución SDS-HCl, se midió la absorbancia a 570 nm con corrección a 630 nm. Se analizaron cuatro pocillos para cada condición, y los resultados se presentan como la media ± DE de cuadruplicados de un experimento representativo que se repitió al menos tres veces.
- 20

25 *Análisis de isobologramas*

- La interacción entre la Aplidina y otros agentes anti-MM se analizó usando el programa de software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO). Los datos del ensayo de viabilidad celular (MTT) se expresaron como la fracción de células afectadas por la dosis (Fa) en las células tratadas con fármaco en comparación con las células sin tratar (control). Este programa se basa en el procedimiento de Chou-Talalay de acuerdo con la siguiente ecuación $IC = (D)1 / (Dx)1 + (D)1(D)2 / (Dx)1(Dx)2$ en la que (D)1 y (D)2 son las dosis de fármaco 1 y 2 que tienen el mismo efecto x cuando se usan por separado.
- 30

- El índice de combinación (IC) calculado mediante ordenador se usó para juzgar los resultados de una combinación: $IC > 1$, $IC = 1$, y $IC < 1$ que indican efectos de antagonismo, aditividad y sinergia, respectivamente. La conformidad de los datos con el principio mediana-efecto se puede expresar fácilmente mediante el coeficiente de correlación lineal (r) del gráfico mediana-efecto: $\log (fa/fu) = m \log (D) - m \log (Dm)$, en el que D es la dosis, Dm es la dosis requerida para un 50 % del efecto, fa es la fracción afectada por la dosis, fu es la fracción no afectada, y m es el coeficiente de sigmoidicidad de la curva dosis-efecto. Para cada combinación se usó una combinación de proporción no constante.
- 35

Resultados

40 Combinación de Aplidina + Lenalidomida (Revlimid®) + Dexametasona

La adición de Dexametasona a la combinación de Aplidina + Lenalidomida mostró una importante sinergia en todas las combinaciones ensayadas en la línea celular sensible (MM1S) (Figura 80). En la Figura 80 las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Lenalidomida se expresan en unidades µM y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

45 Combinación de Aplidina + Bortezomib + Dexametasona

La adición de Dexametasona a la combinación de Aplidina con Bortezomib dio como resultado diversas dosis con una clara tendencia a la sinergia (Figura 81). En la Figura 81 las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Bortezomib se expresan en unidades nM y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

Combinación de Aplidina + Bortezomib + Lenalidomida (Revlimid®)

- 50 La adición de Bortezomib a la combinación de Aplidina con un agente inmunomodulador tal como la Lenalidomida aumentaba claramente su efecto antitumoral con un IC en el intervalo sinérgico en MM1S (Figura 82). En la Figura 82 las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Bortezomib se expresan en unidades nM y las dosis de Lenalidomida se expresan en unidades µM.

Combinación de Aplidina + Talidomida + Dexametasona

Esta combinación mostraba una clara sinergia en las combinaciones triples tal y como puede verse en la Figura 83. En la Figura 83 las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Talidomida se expresan en unidades μM y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

5 Combinación de Aplidina + Melfalán + Dexametasona

Esta combinación mostraba también un claro intervalo sinérgico, principalmente con dosis altas de los fármacos (Figura 84). En la Figura 84 las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Melfalán se expresan en unidades μM y las dosis de Dexametasona se expresan en unidades nM.

Combinación de Aplidina + Melfalán + Bortezomib

- 10 Esta combinación dio como resultado un IC en el intervalo sinérgico cuando se usaban dosis altas (Figura 85). En la Figura 85 las dosis de Aplidina se expresan en unidades nM, las dosis de Melfalán se expresan en unidades μM y las dosis de Bortezomib se expresan en unidades nM.

- 15 Estos resultados con respecto a la Aplidina se pueden extender a los análogos de la aplidina, derivados y compuestos relacionados. Por ejemplo, los autores describen una combinación de un compuesto tal como los del documento WO 02 02596 con un fármaco antitumoral, preferentemente paclitaxel (Taxol®), doxorubicina, cisplatino, trióxido de arsénico, 5-fluorouracilo (5-FU), arabinósido de citosina (AraC), carboplatino, 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN38), etopósido (VP16), melfalán, dexametasona, ciclofosfamida, bortezomib, erlotinib, trastuzumab, lenalidomida (Revlimid®), interleucina-2 (IL-2), interferón- α 2 (INF- α), dacarbazina (DTIC), bevacizumab (Avastin®), idarrubicina, talidomida, y rituximab.

- 20 Ejemplos de análogos de la aplidina que se pueden usar en lugar de la propia Aplidina incluyen los compuestos preferentes proporcionados en el documento WO 02 02596. Más preferentemente, los análogos son estructuralmente próximos a la Aplidina, y normalmente difieren de la Aplidina con respecto a un aminoácido o a la cadena terminal lateral. El aminoácido diferente puede estar en la parte cíclica de la molécula o en la cadena lateral. Muchos ejemplos de tales compuestos se dan en el documento WO 02 02596.

25

REIVINDICACIONES

1. Aplidina para su uso en un procedimiento de tratamiento de mieloma múltiple mediante terapia de combinación empleando Aplidina en combinación sinérgica con dexametasona.
- 5 2. Aplidina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la Aplidina y la dexametasona forman parte de la misma composición.
3. Aplidina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la Aplidina y la dexametasona se proporcionan como composiciones separadas, en el que la dexametasona se administra antes, durante o después de la administración de la Aplidina.
- 10 4. Aplidina para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la Aplidina y la dexametasona se proporcionan como composiciones separadas, en el que la dexametasona se administra antes o después de la administración de la Aplidina.

Ejemplo de análisis de regresión lineal

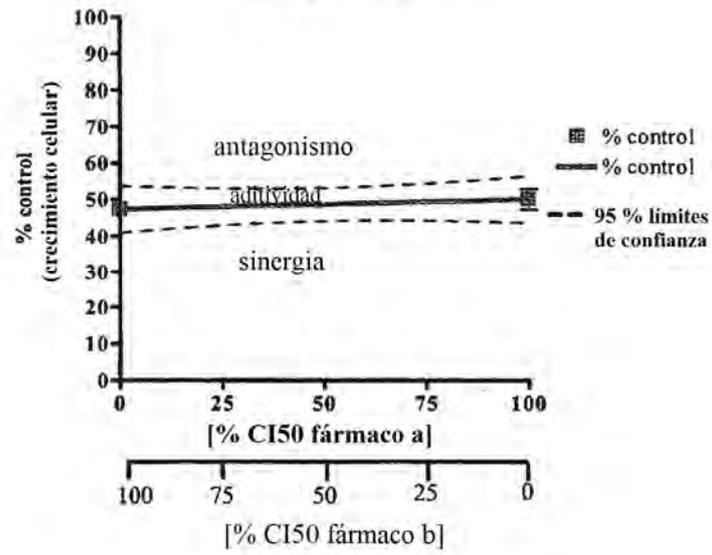


Figura 1

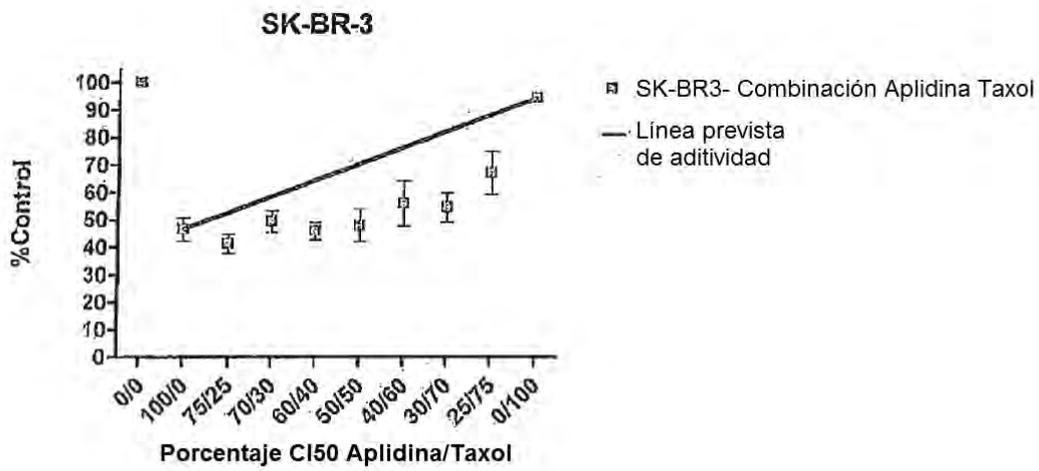


Figura 2

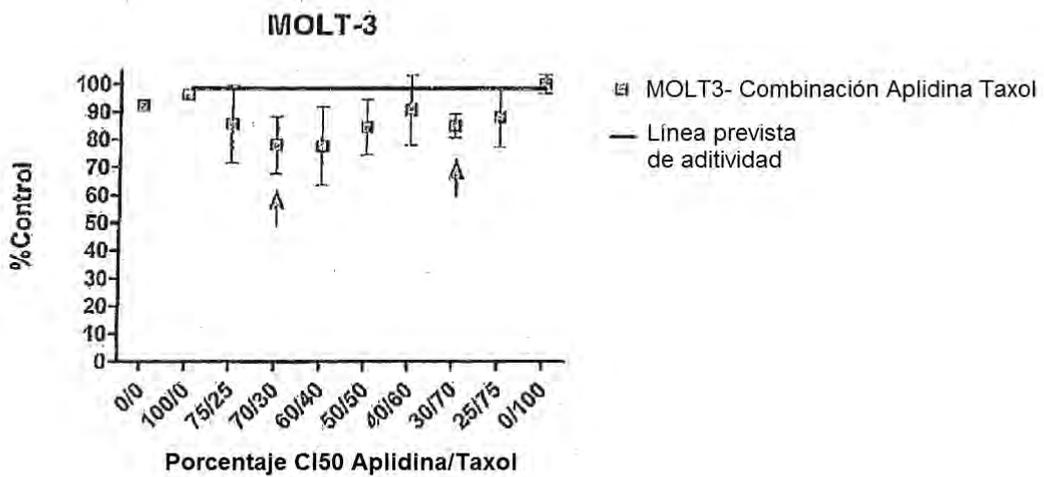


Figura 3

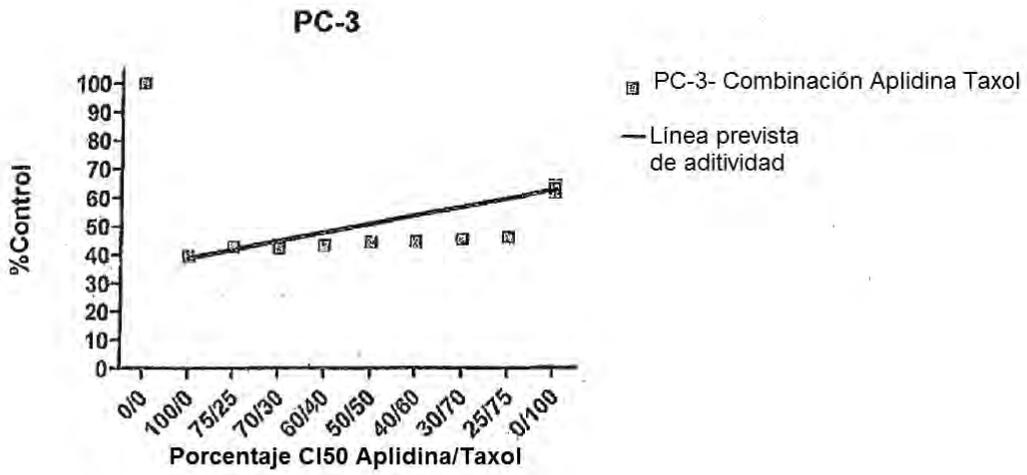


Figura 4

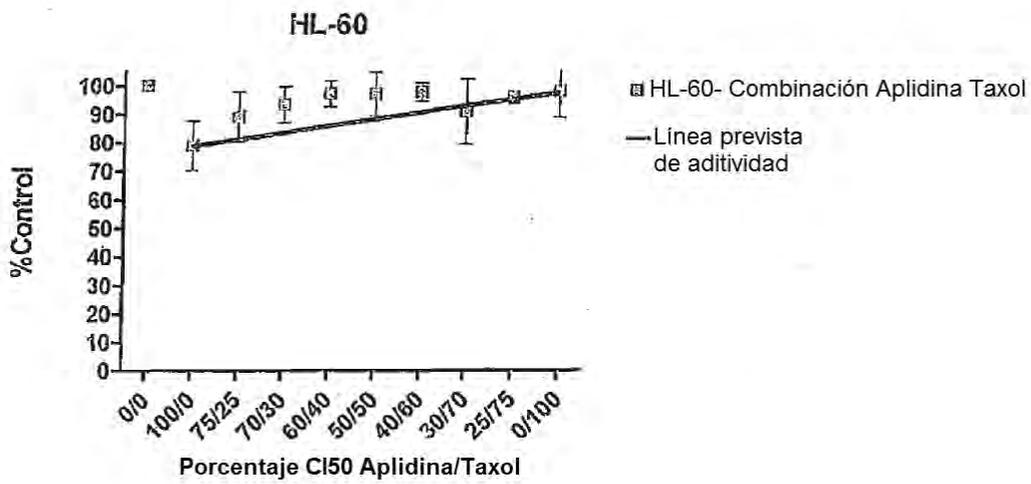


Figura 5

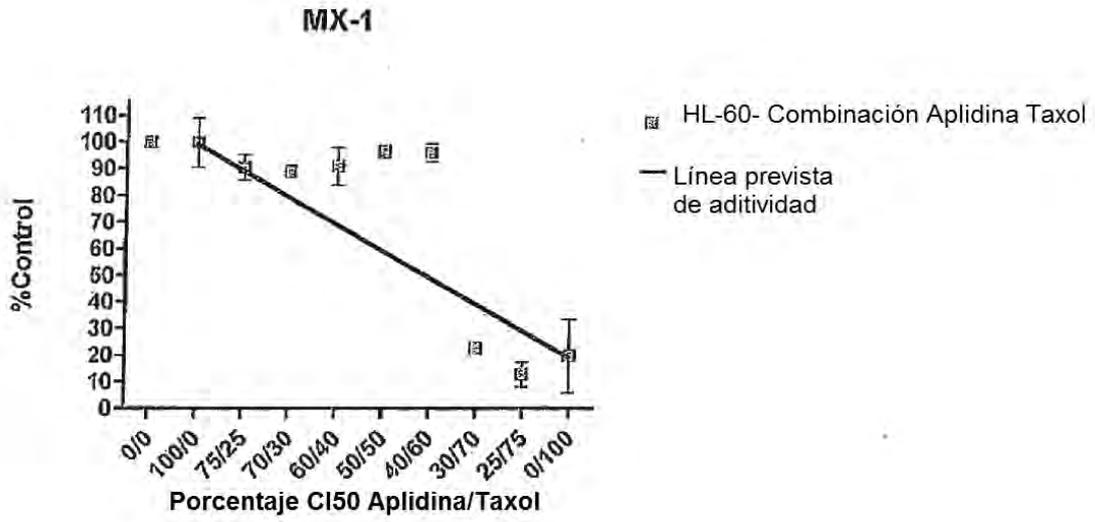


Figura 6

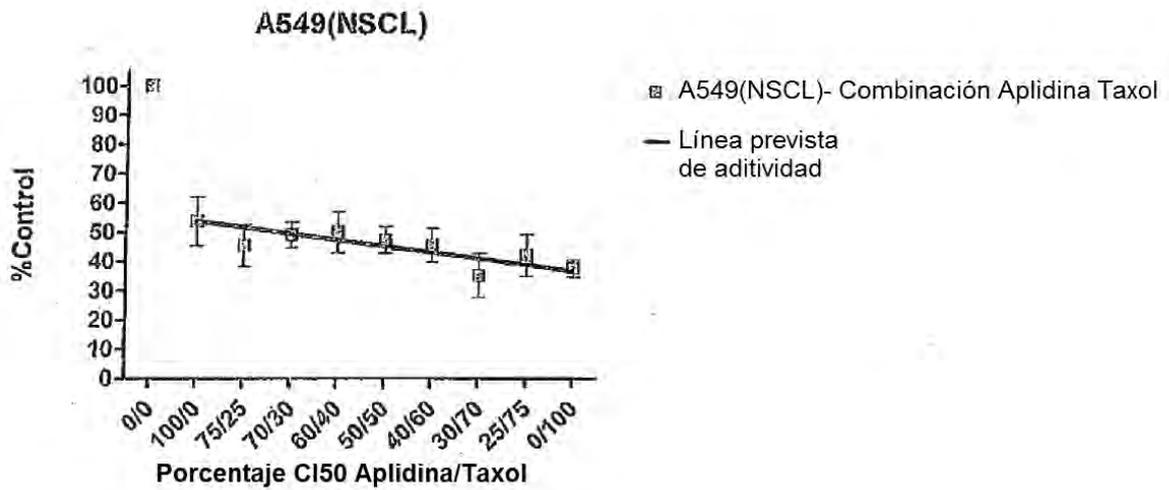


Figura 7

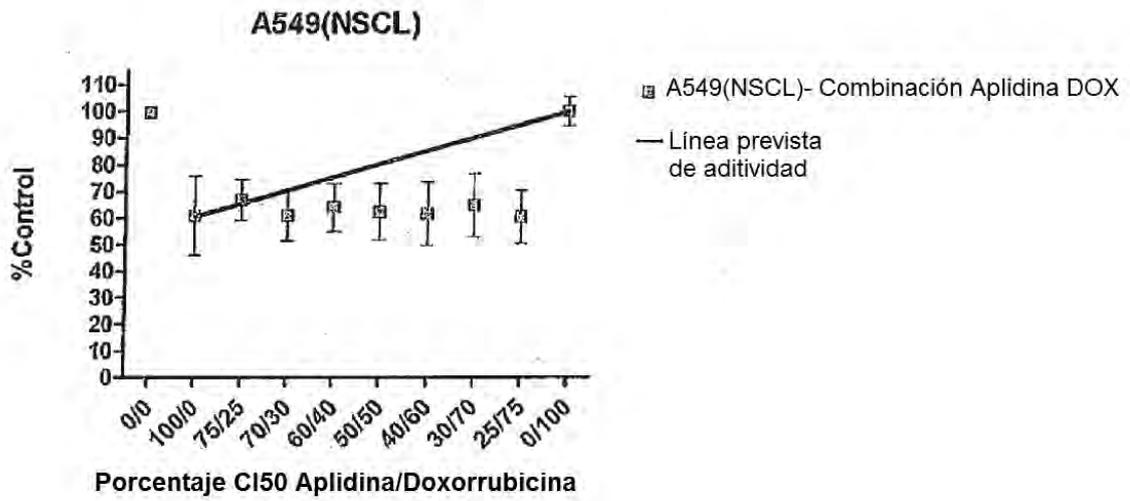


Figura 8

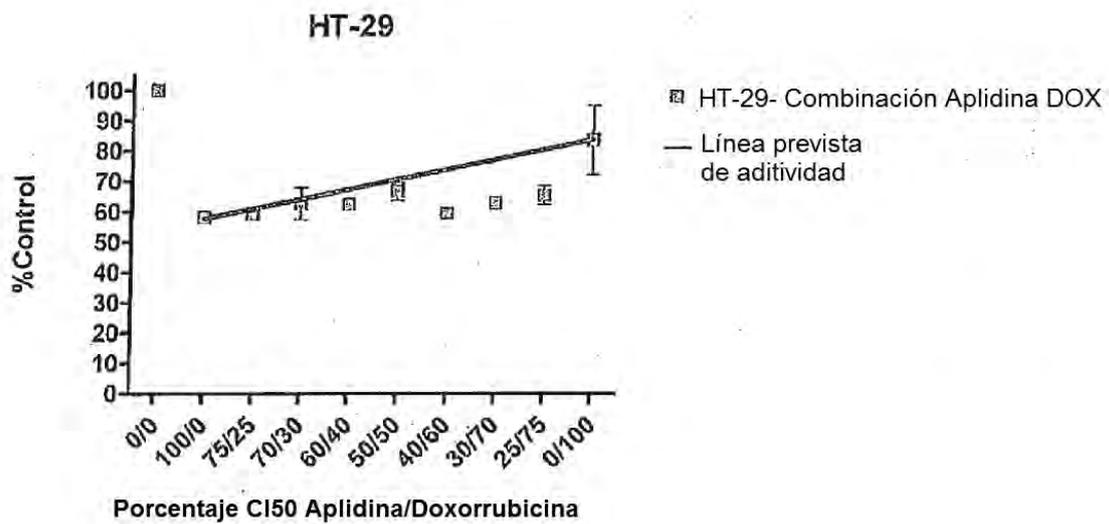


Figura 9

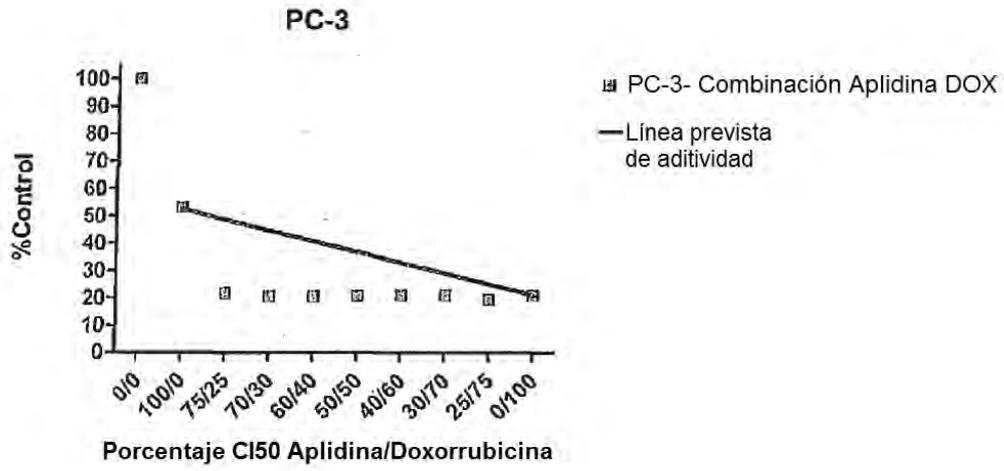


Figura 10

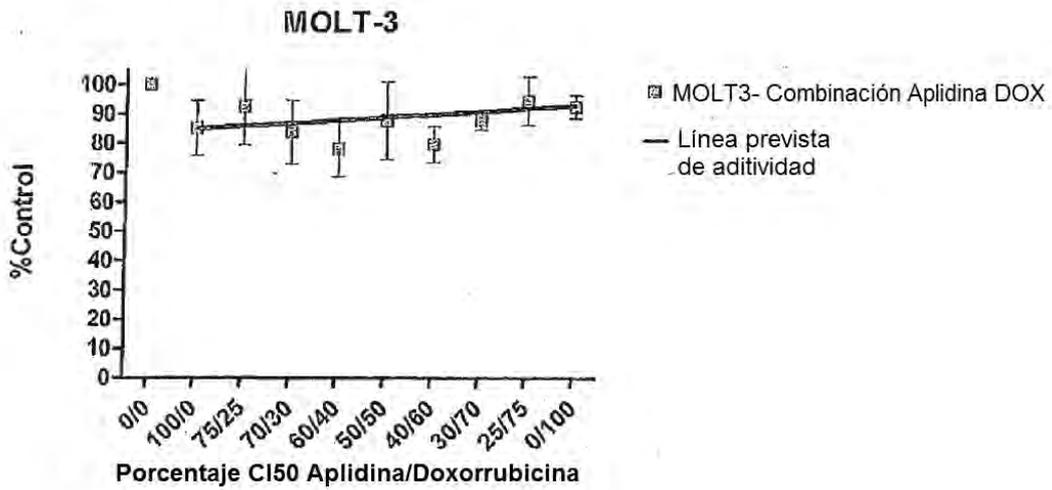


Figura 11

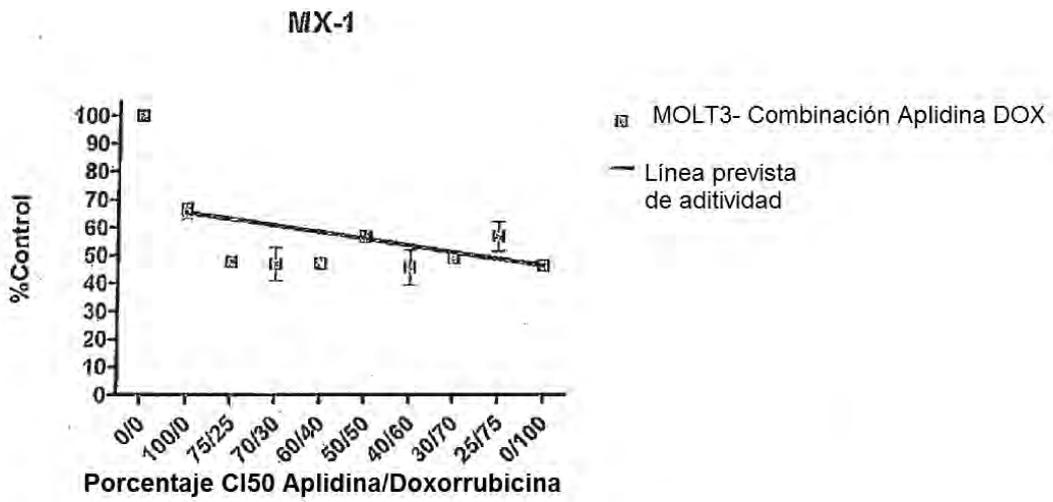


Figura 12

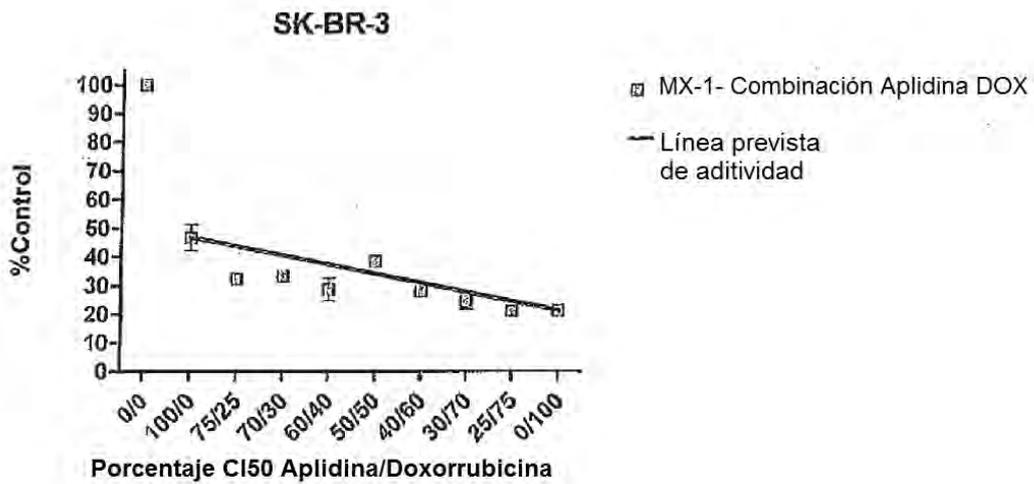


Figura 13

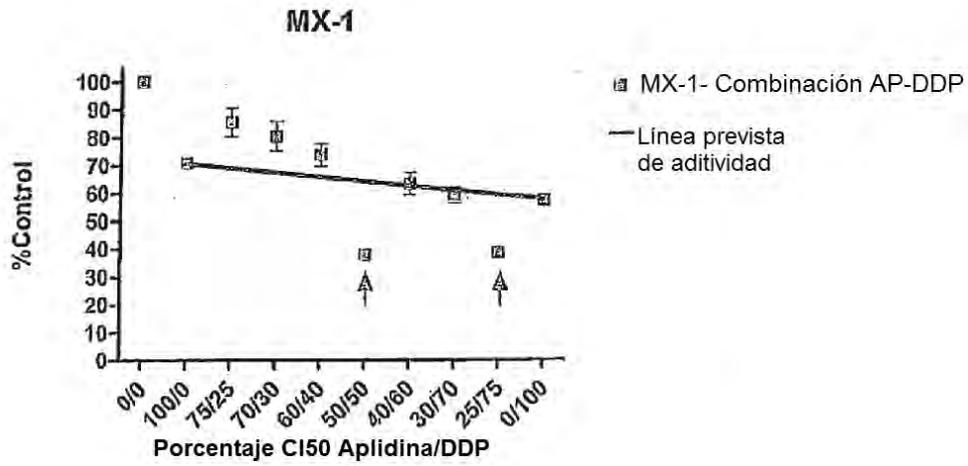


Figura 14

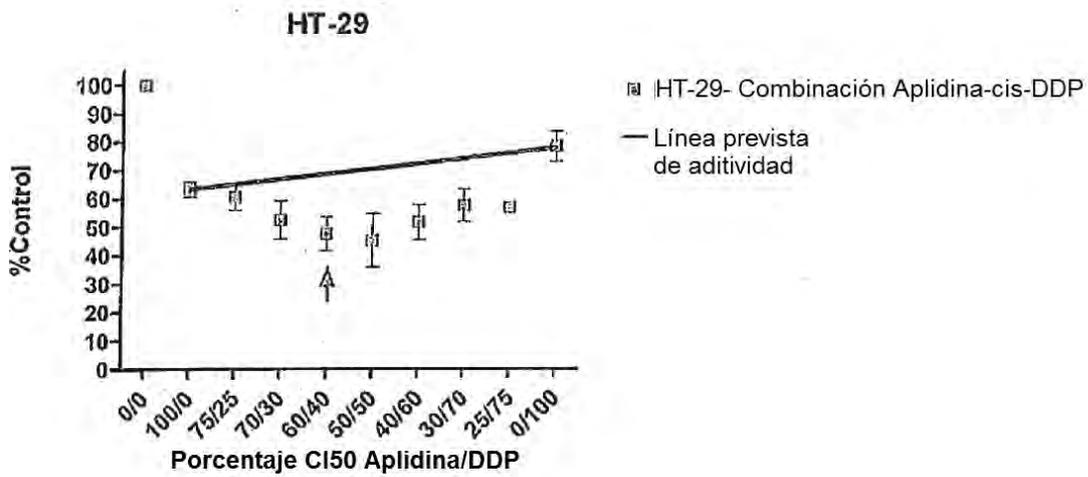


Figura 15

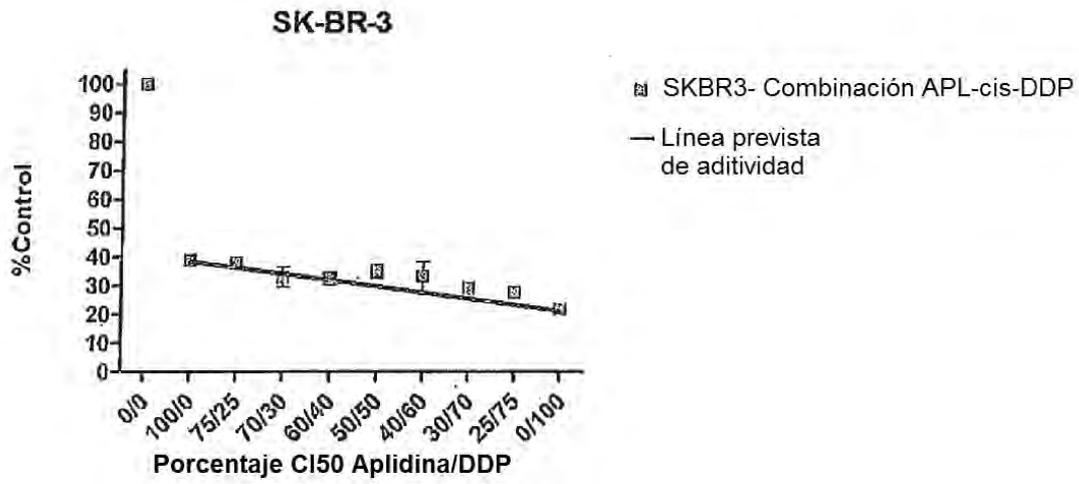


Figura 16

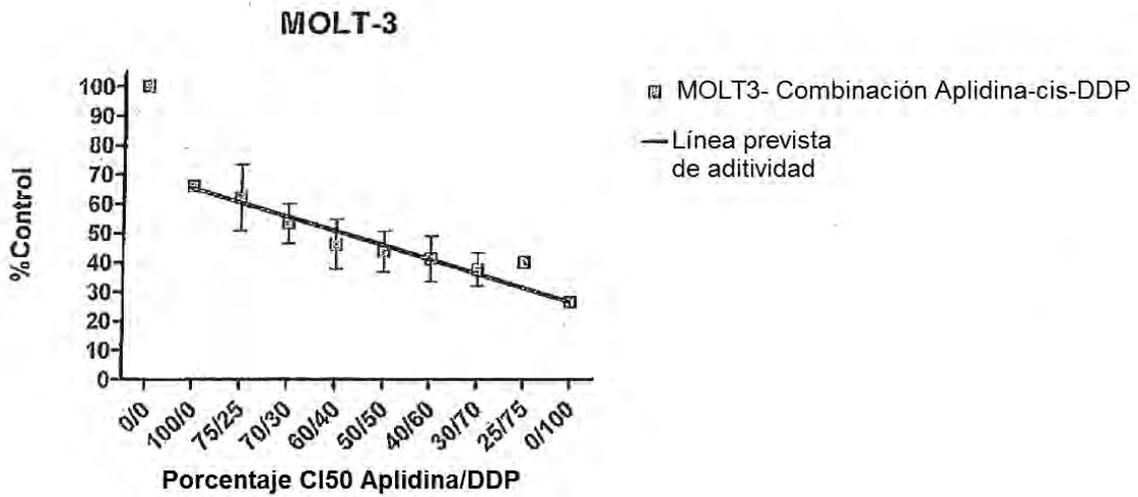


Figura 17

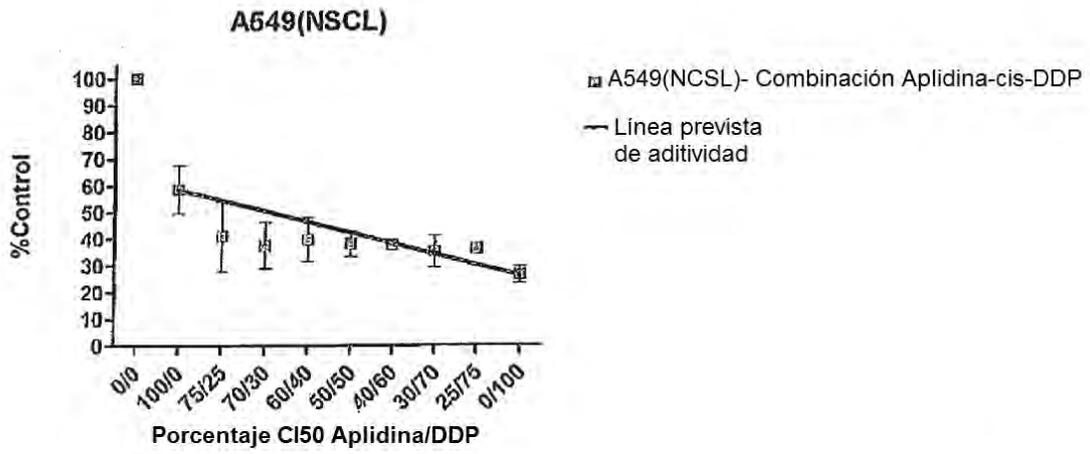


Figura 18

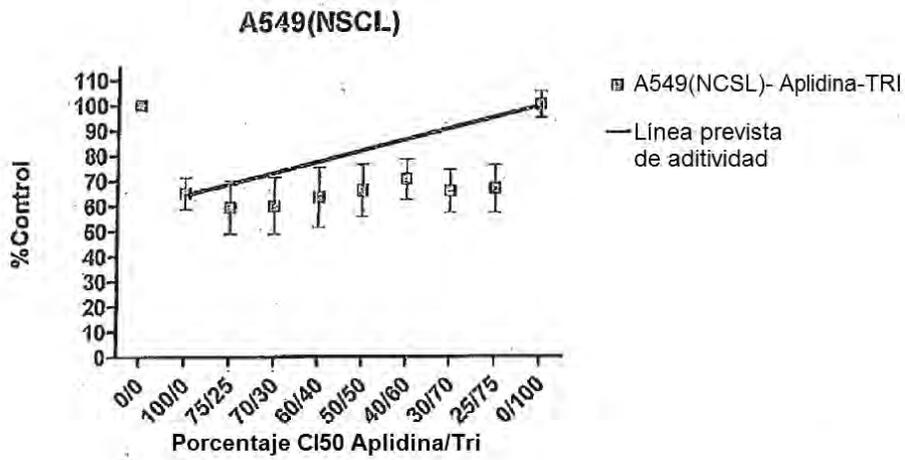


Figura 19

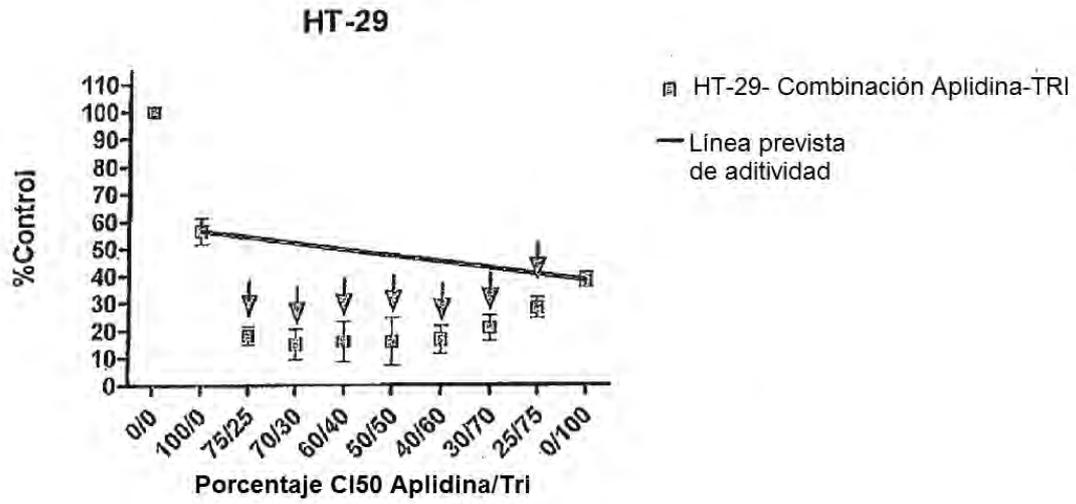


Figura 20

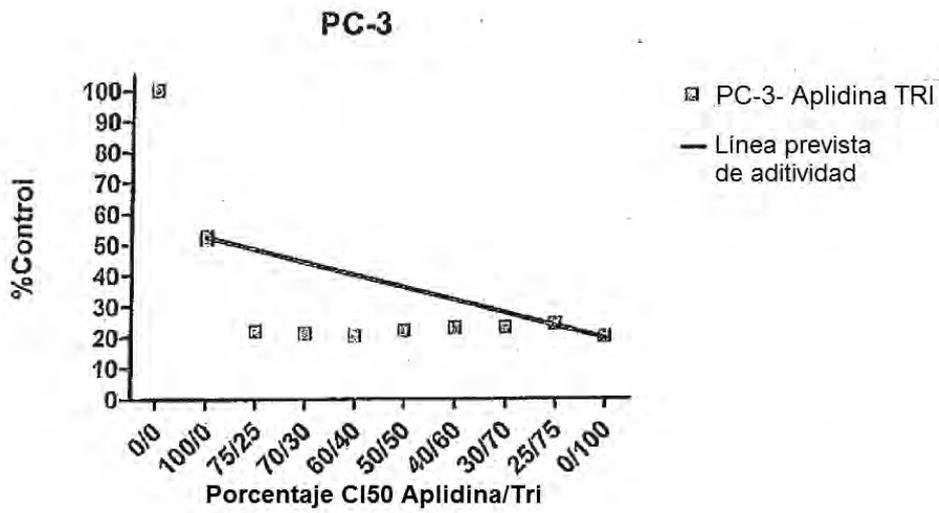


Figura 21

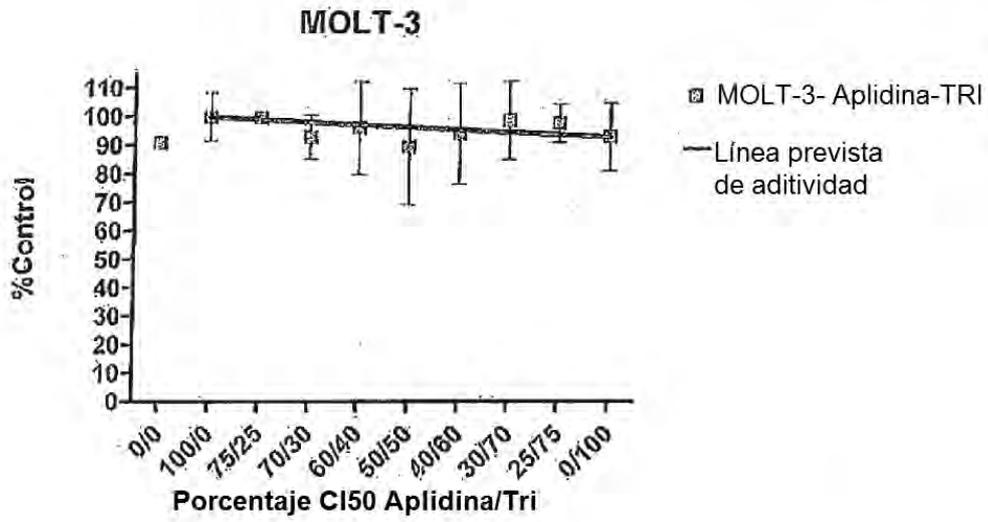


Figura 22

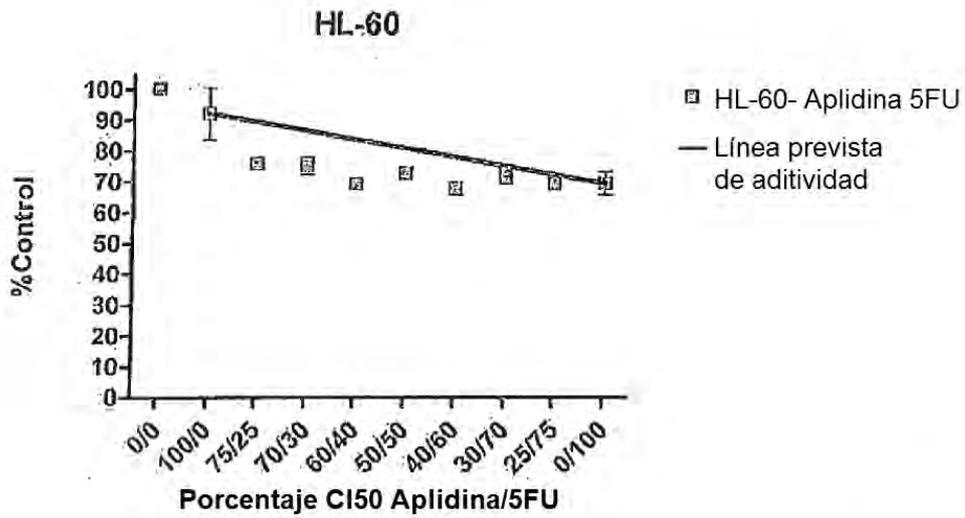


Figura 23

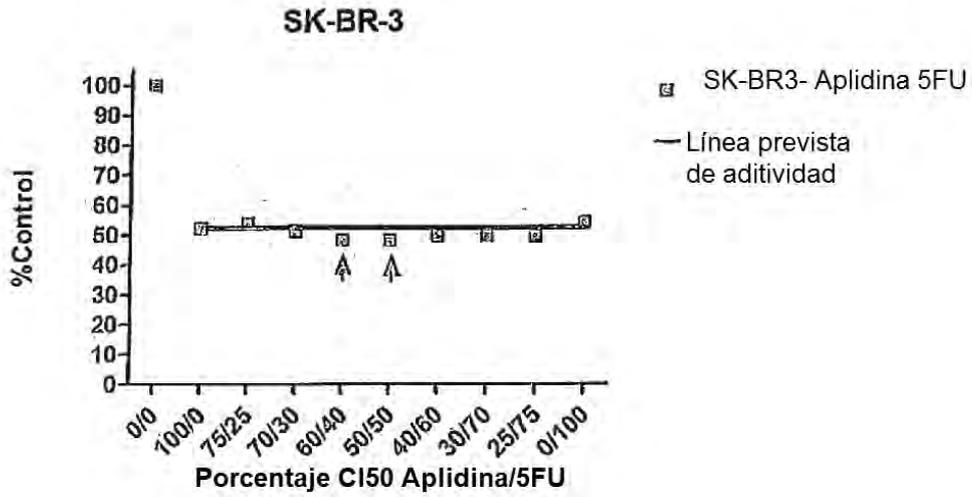


Figura 24

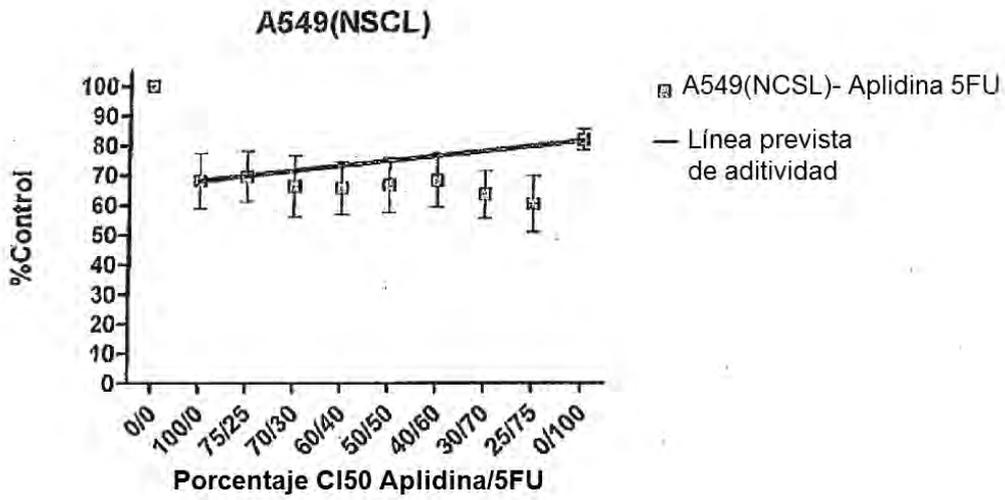


Figura 25

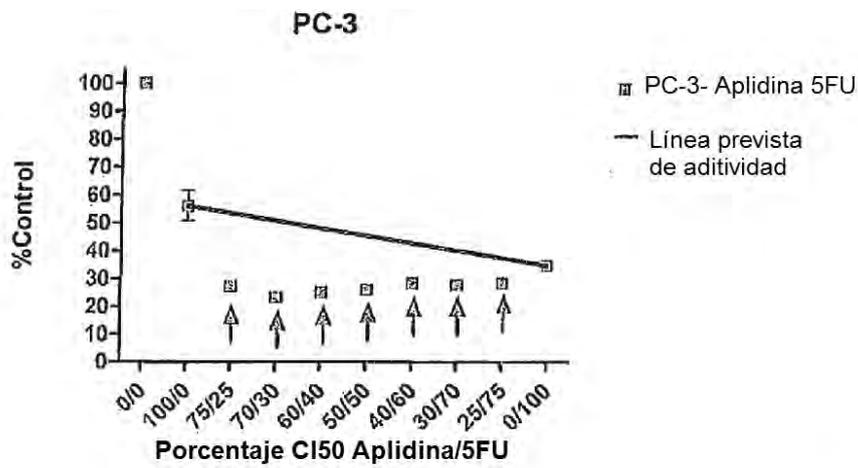


Figura 26

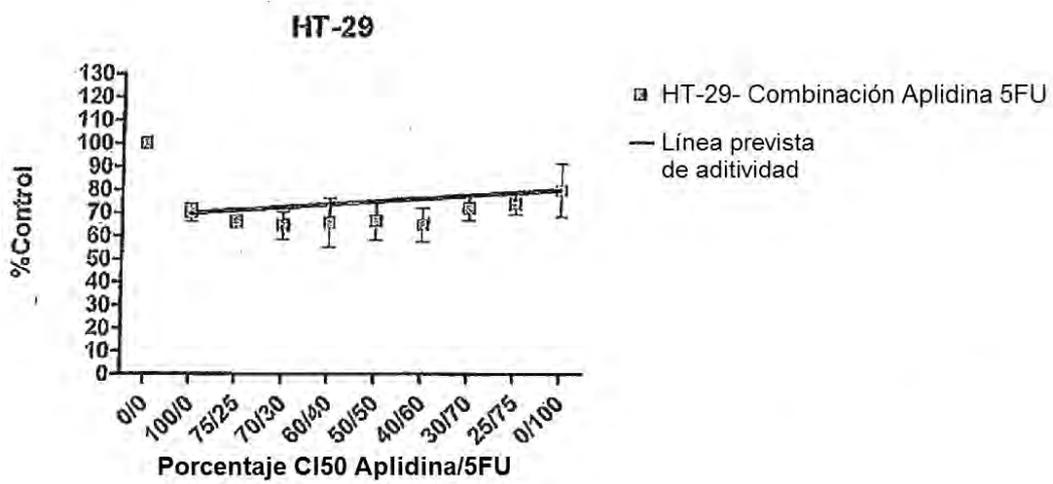


Figura 27

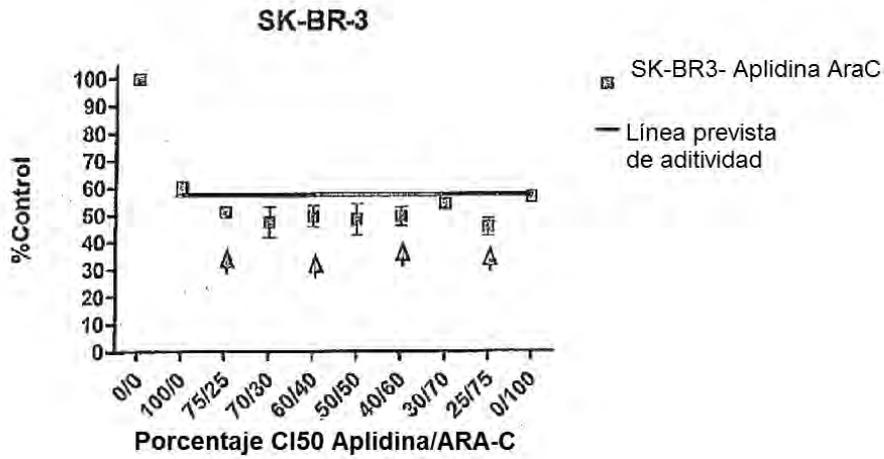


Figura 28

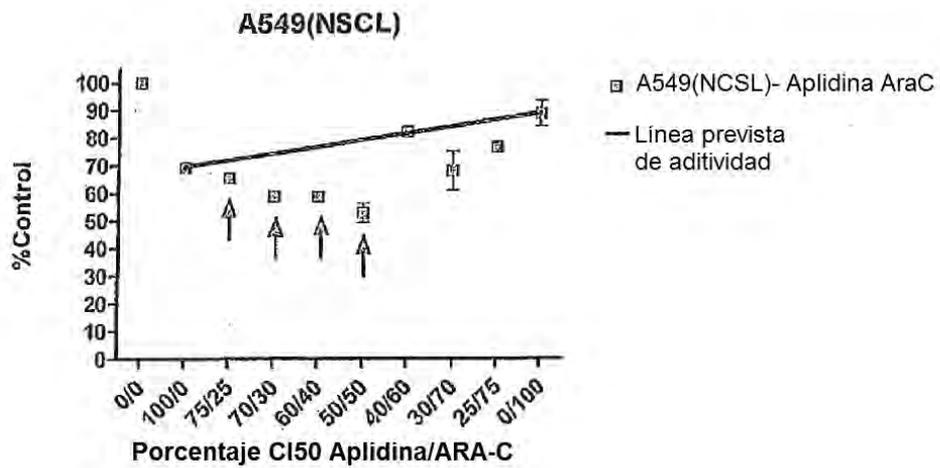


Figura 29

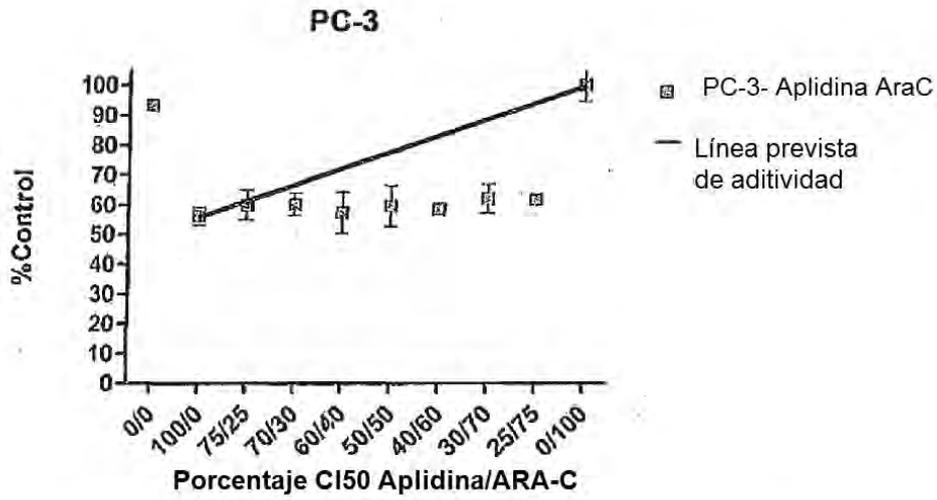


Figura 30

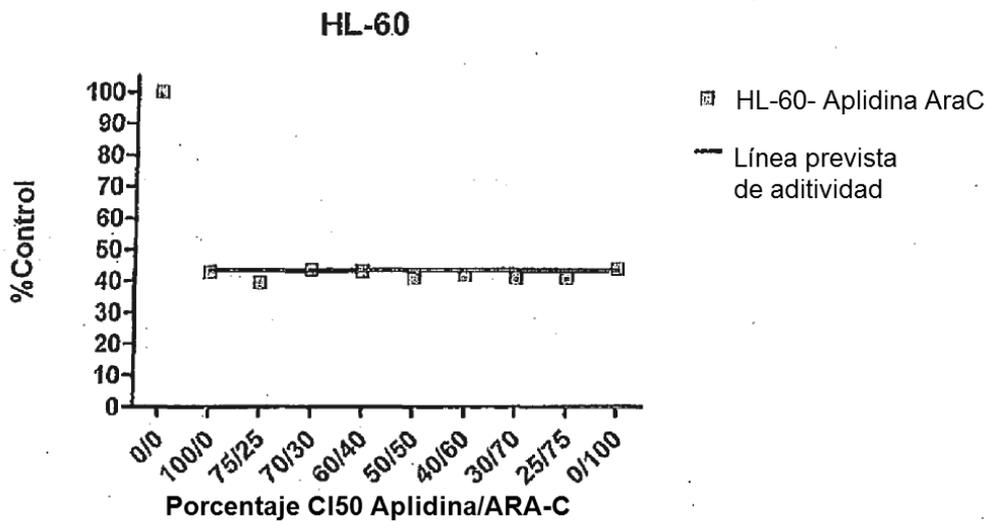


Figura 31

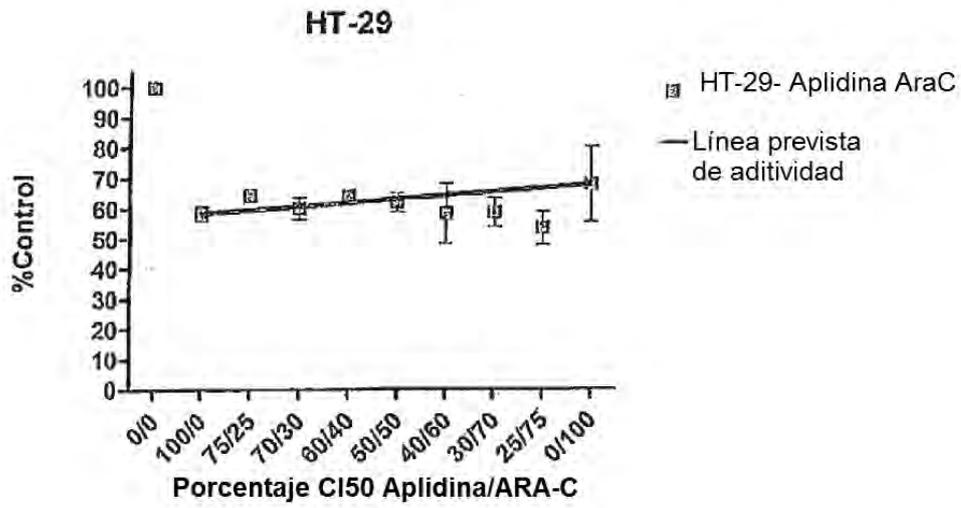


Figura 32

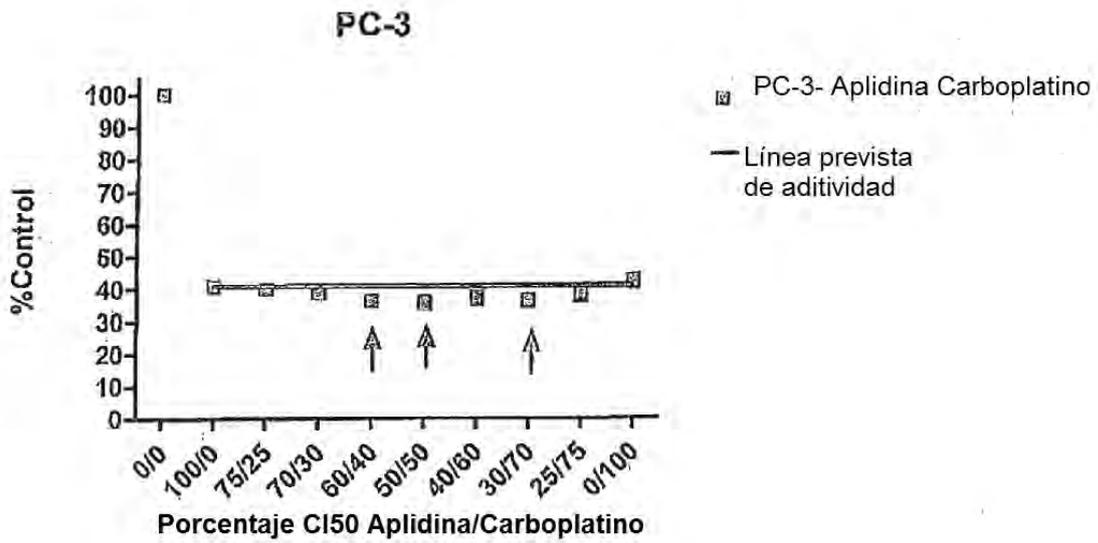


Figura 33

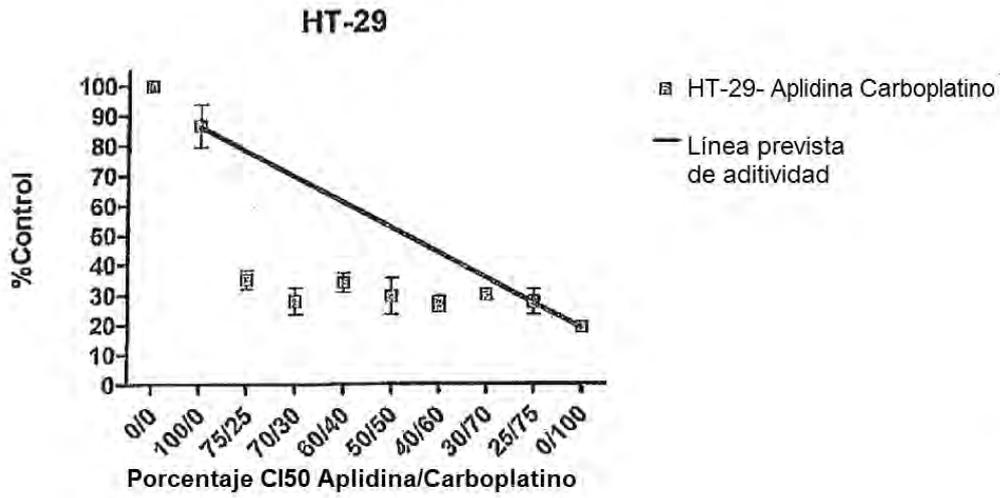


Figura 34

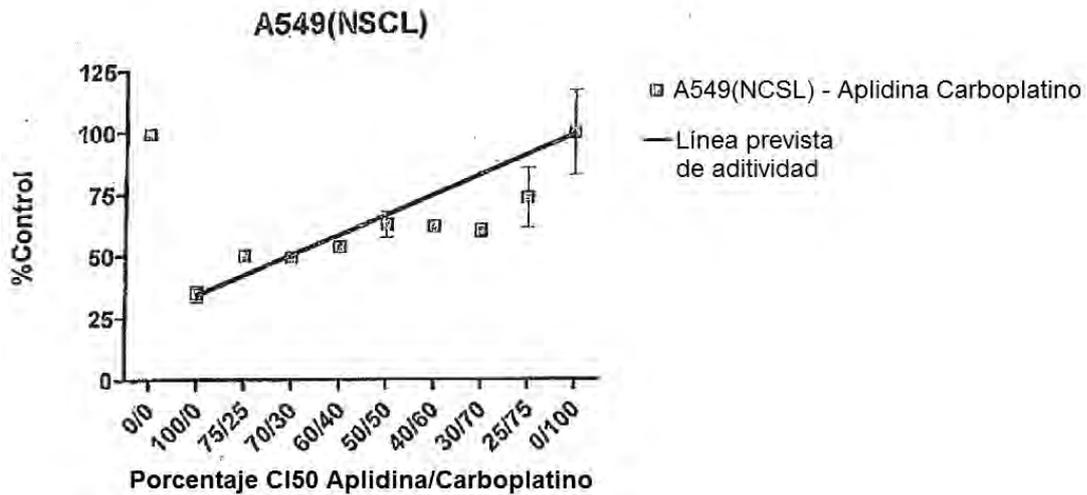


Figura 35

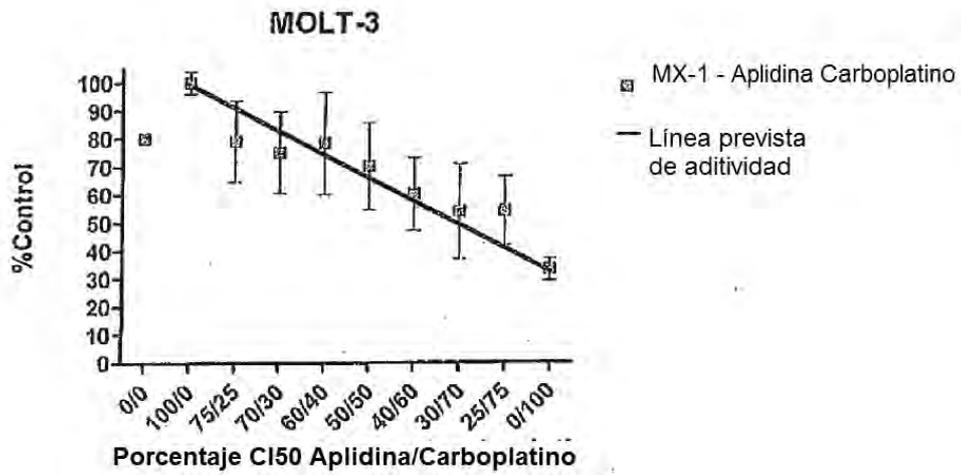


Figura 36

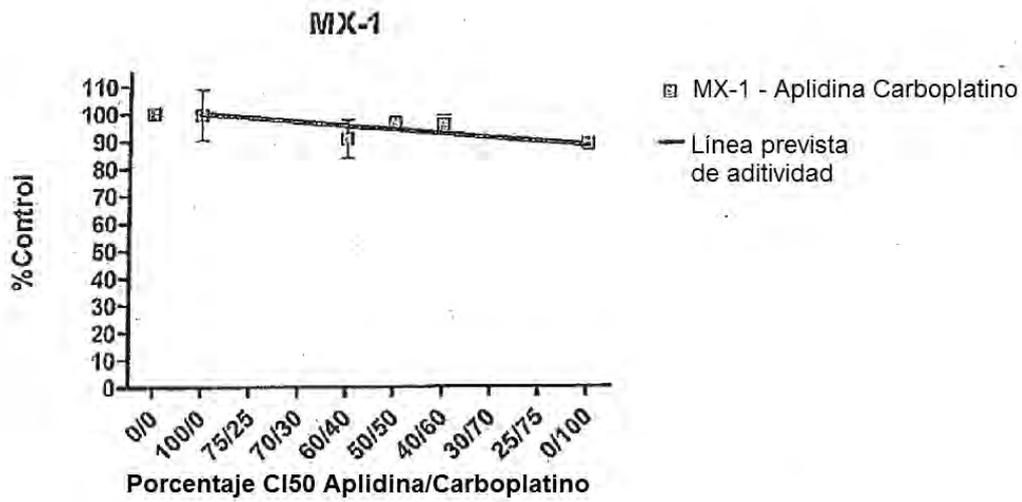


Figura 37

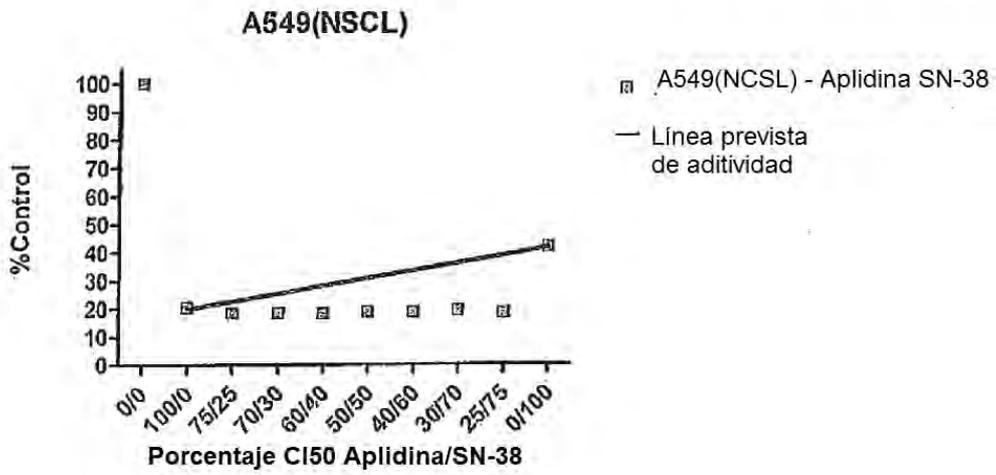


Figura 38

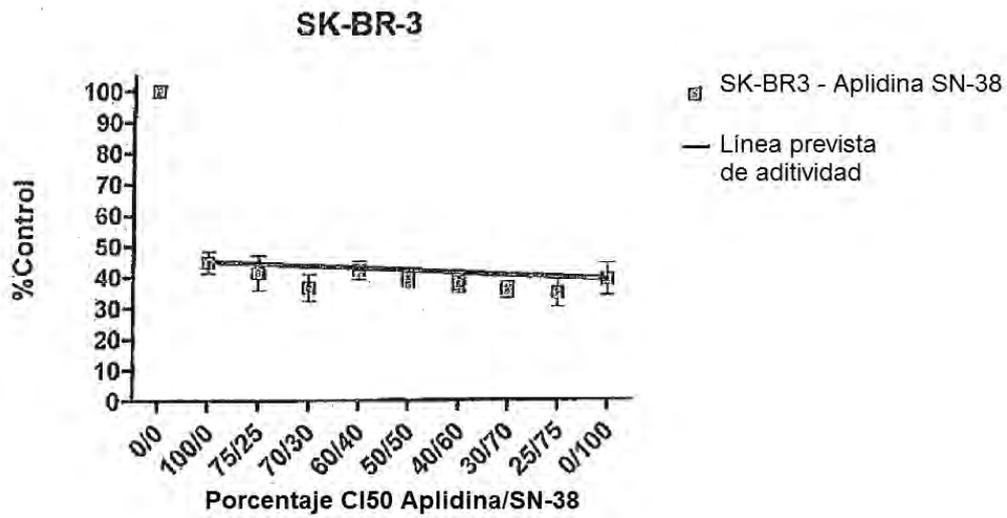


Figura 39

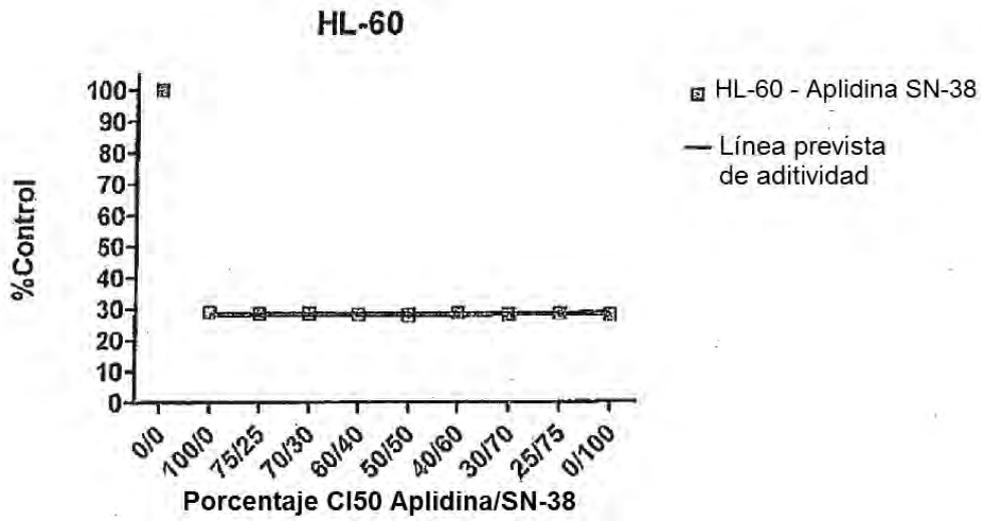


Figura 40

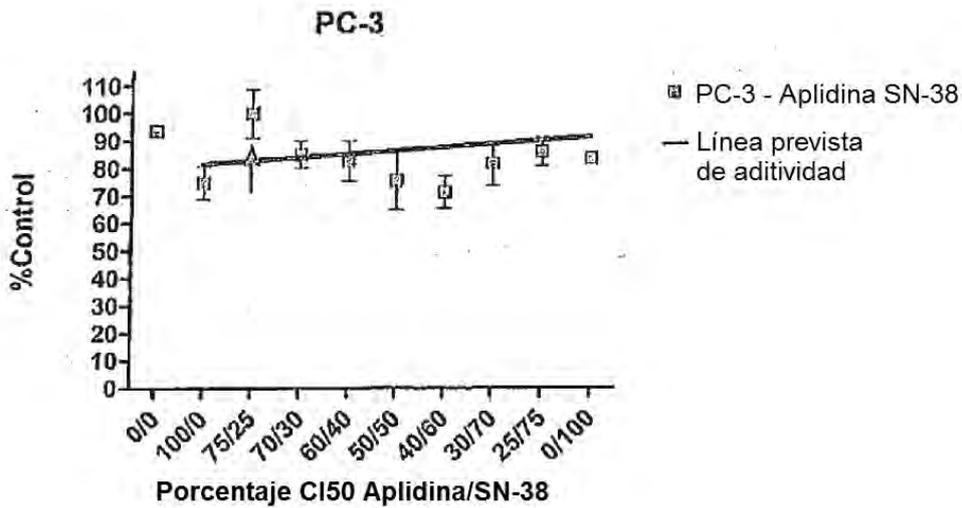


Figura 41

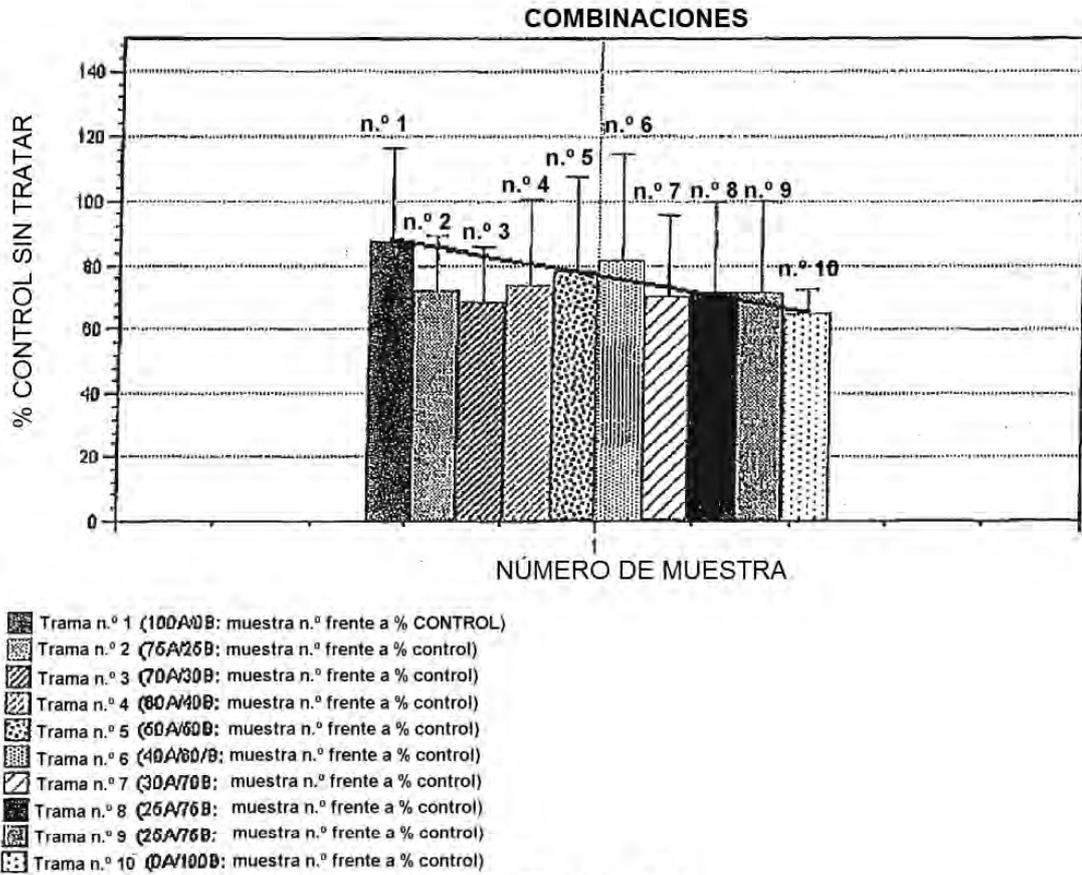


Figura 42A

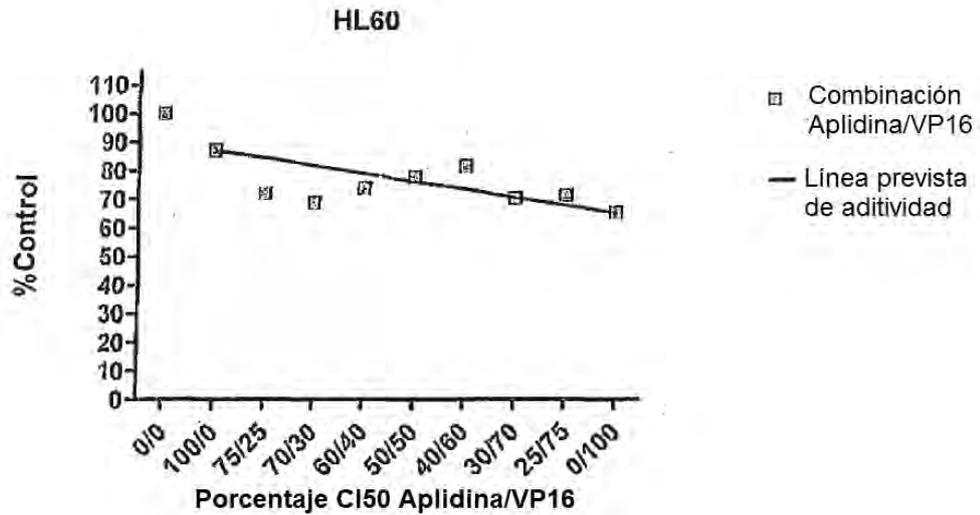


Figura 42B

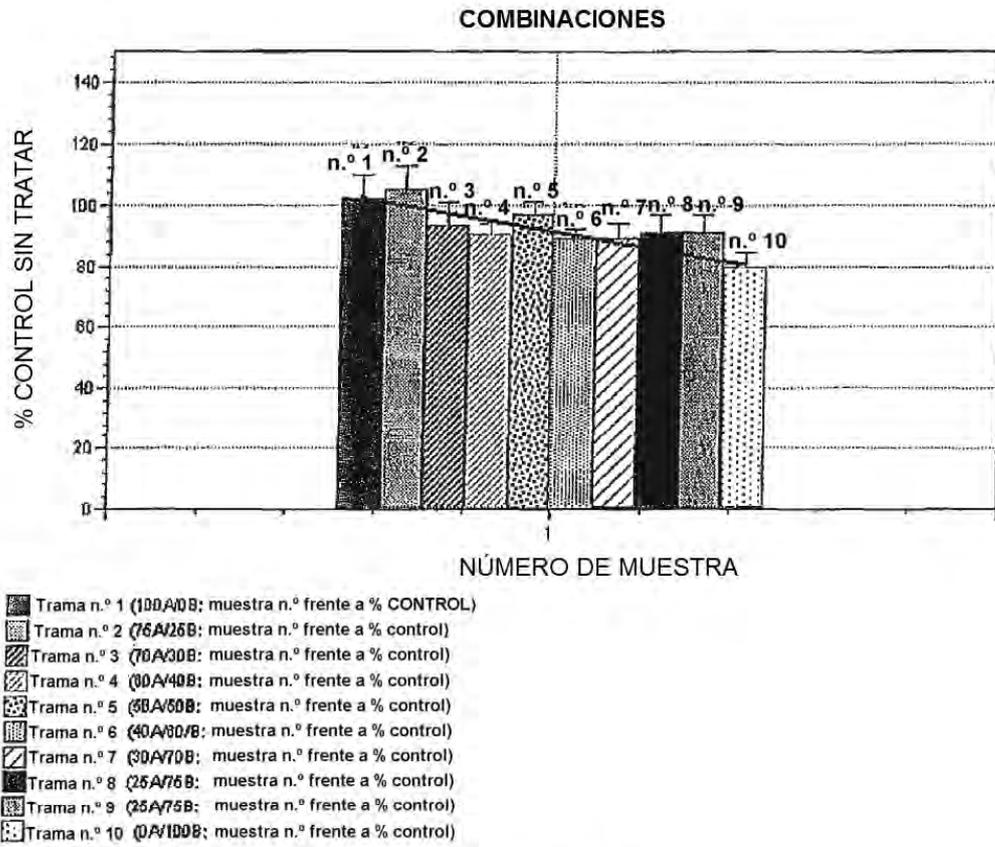


Figura 43A

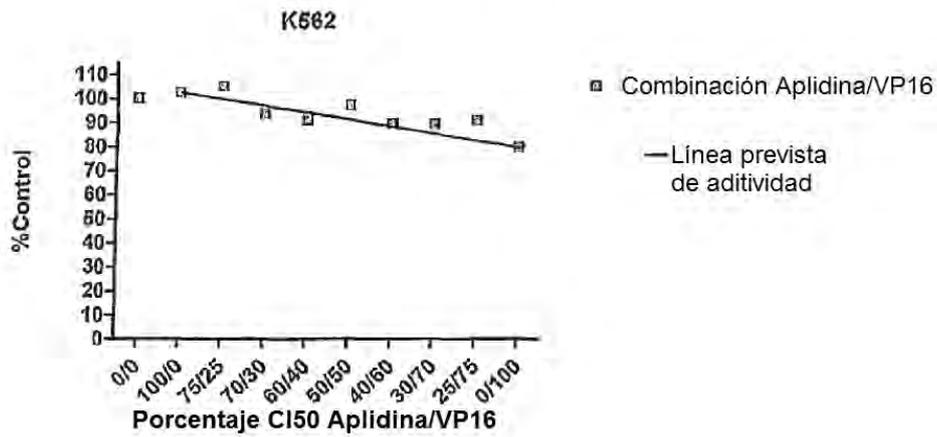


Figura 43B

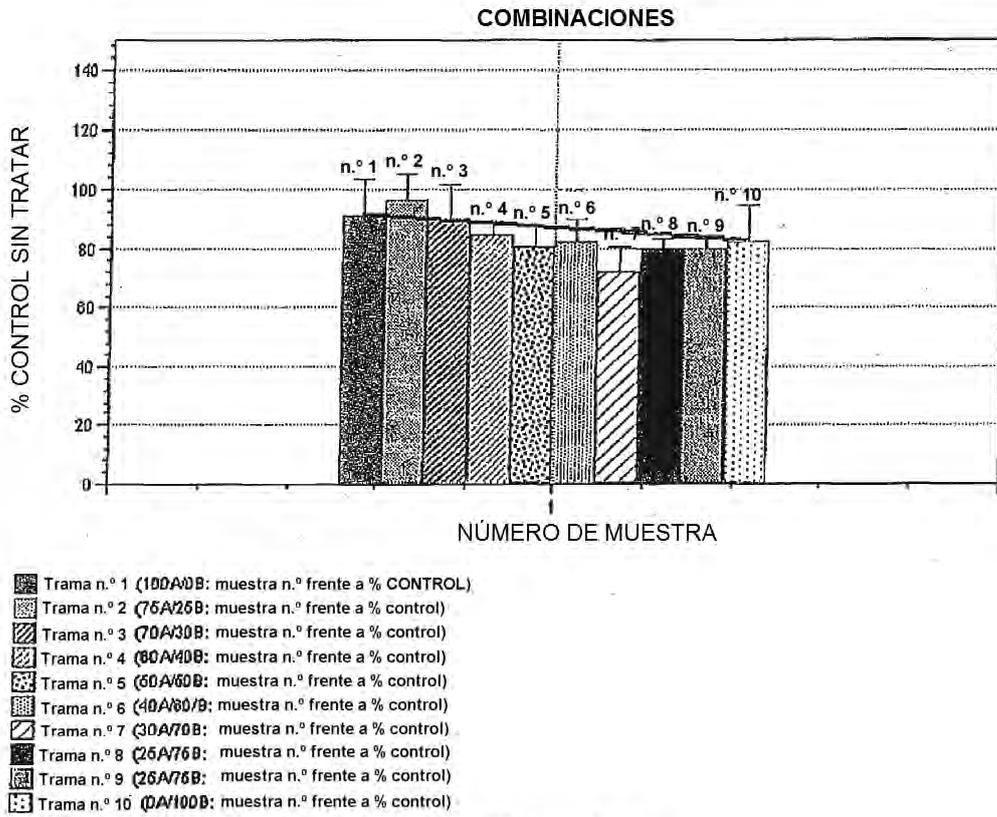


Figura 44A

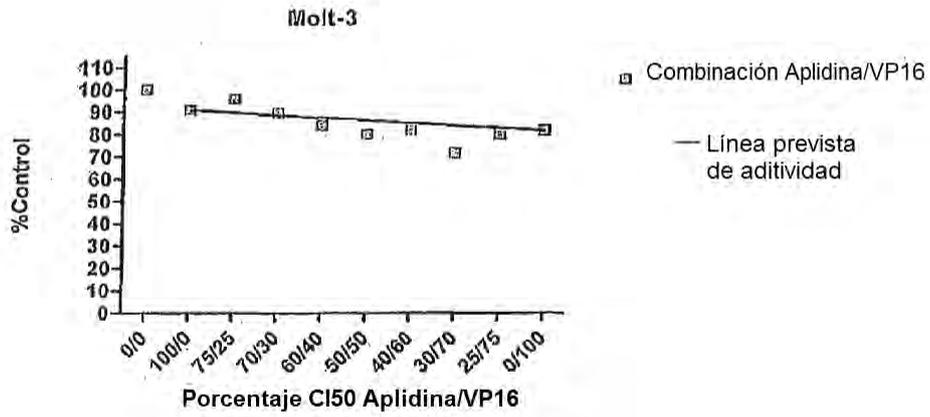


Figura 44B

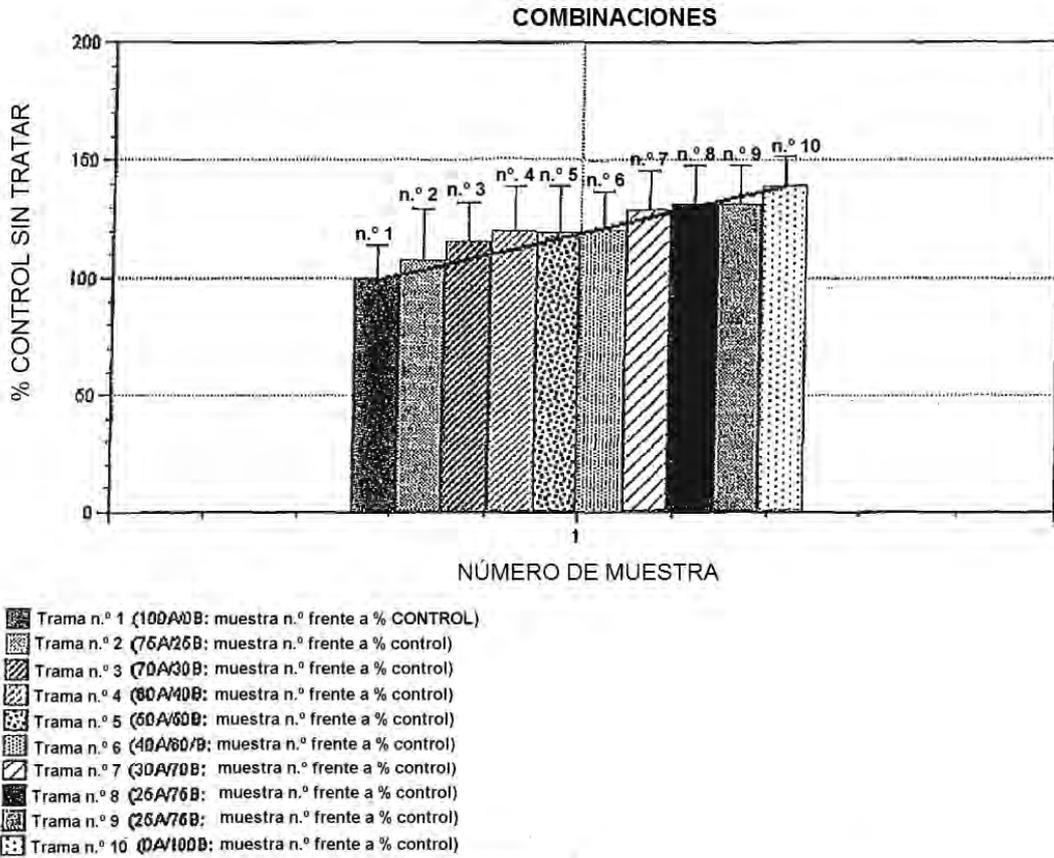


Figura 45A

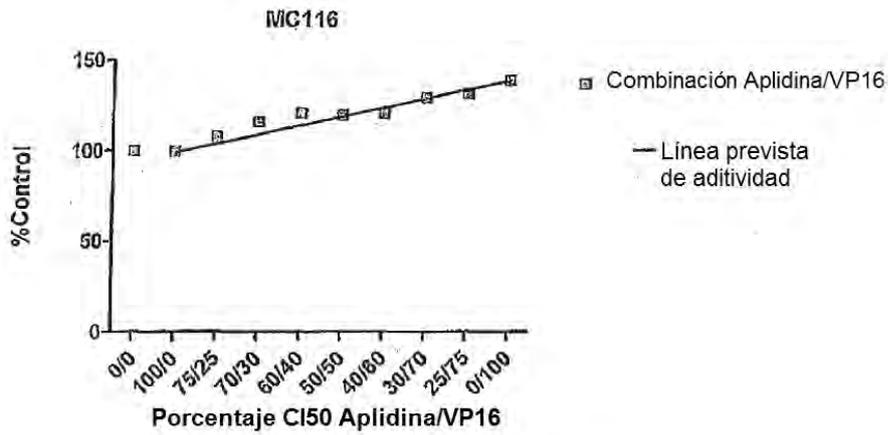
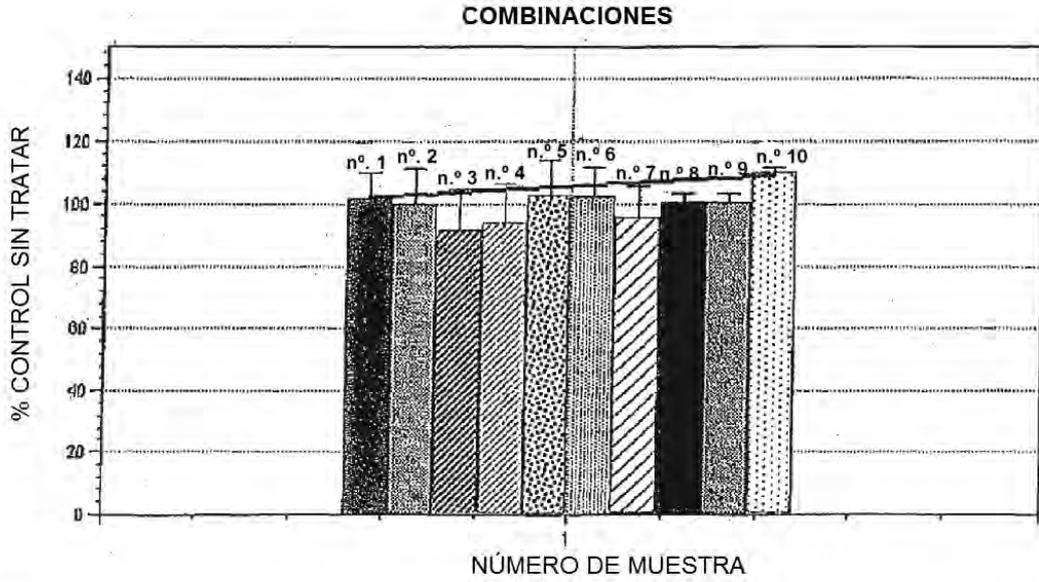


Figura 45B



- Trama n.º 1 (100A00B: muestra n.º frente a % CONTROL)
- Trama n.º 2 (75A25B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 3 (70A30B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 4 (60A40B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 5 (60A60B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 6 (40A80B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 7 (30A70B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 8 (25A76B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 9 (25A76B: muestra n.º frente a % control)
- Trama n.º 10 (0A100B: muestra n.º frente a % control)

Figura 46A

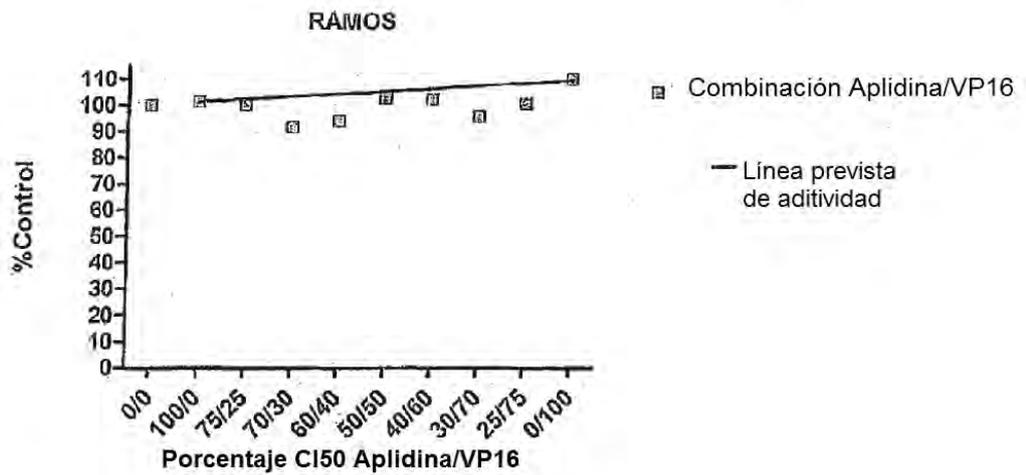


Figura 46B

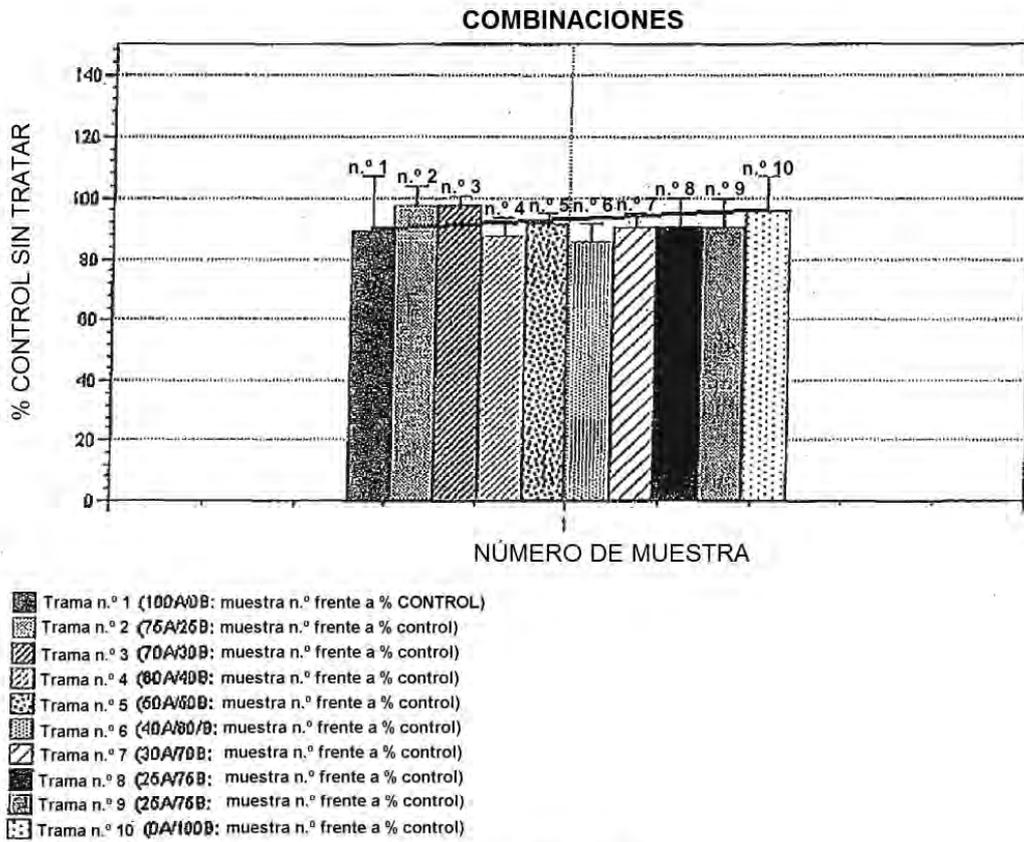


Figura 47A

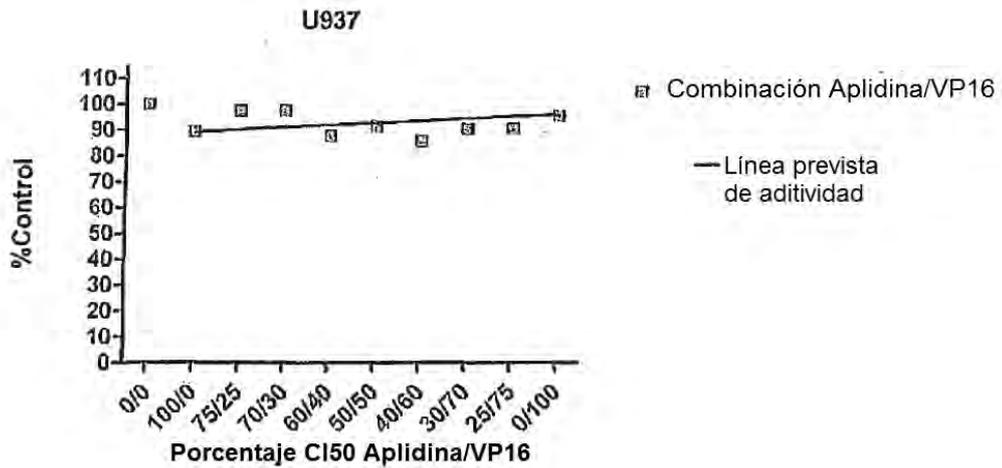


Figura 47B

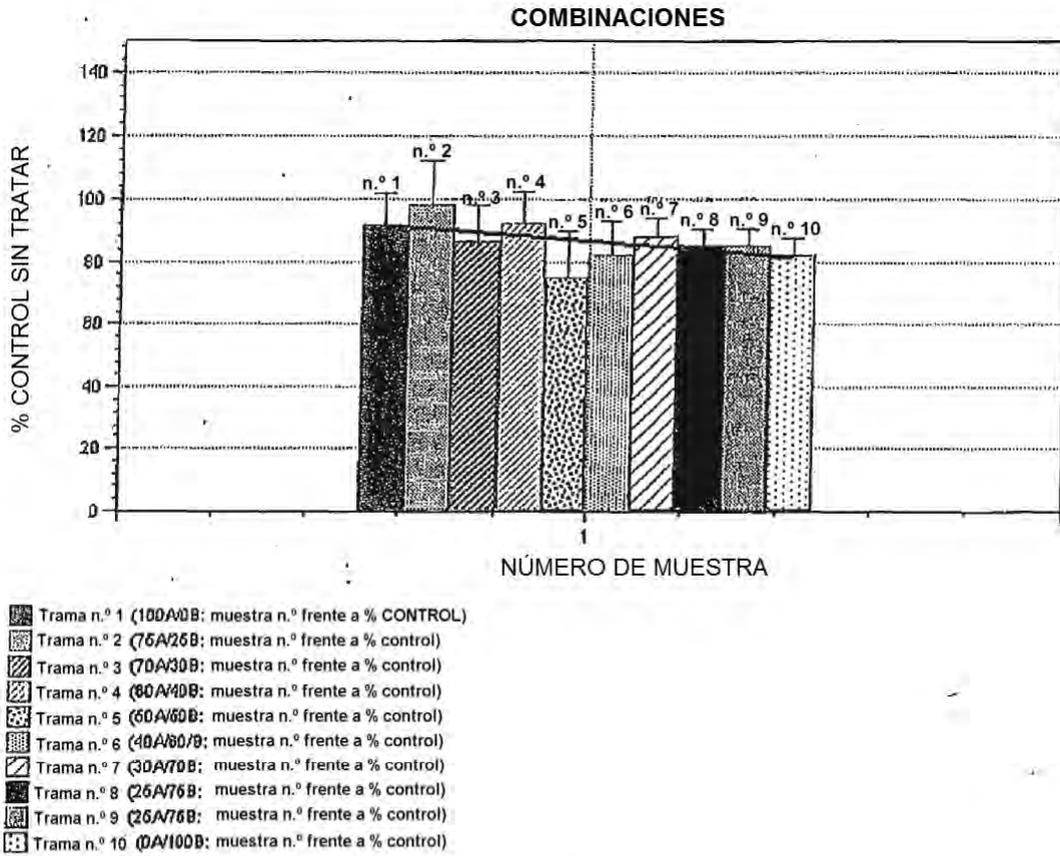


Figura 48A

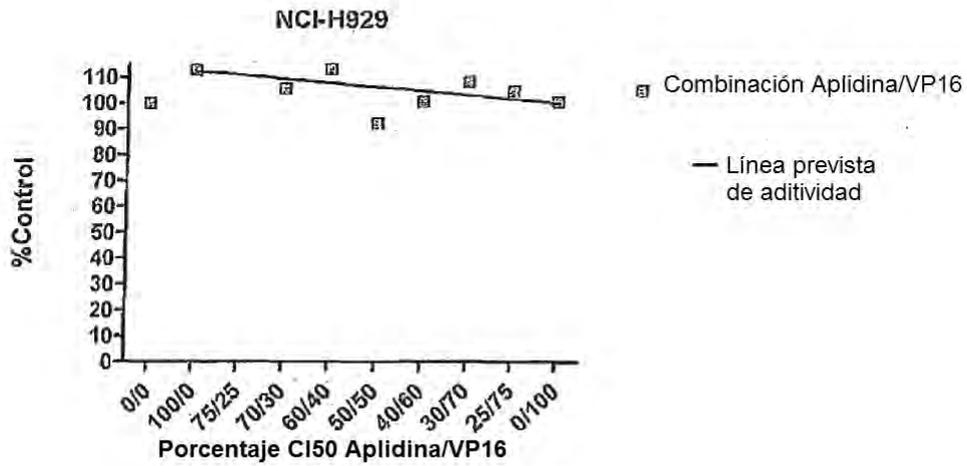


Figura 48B

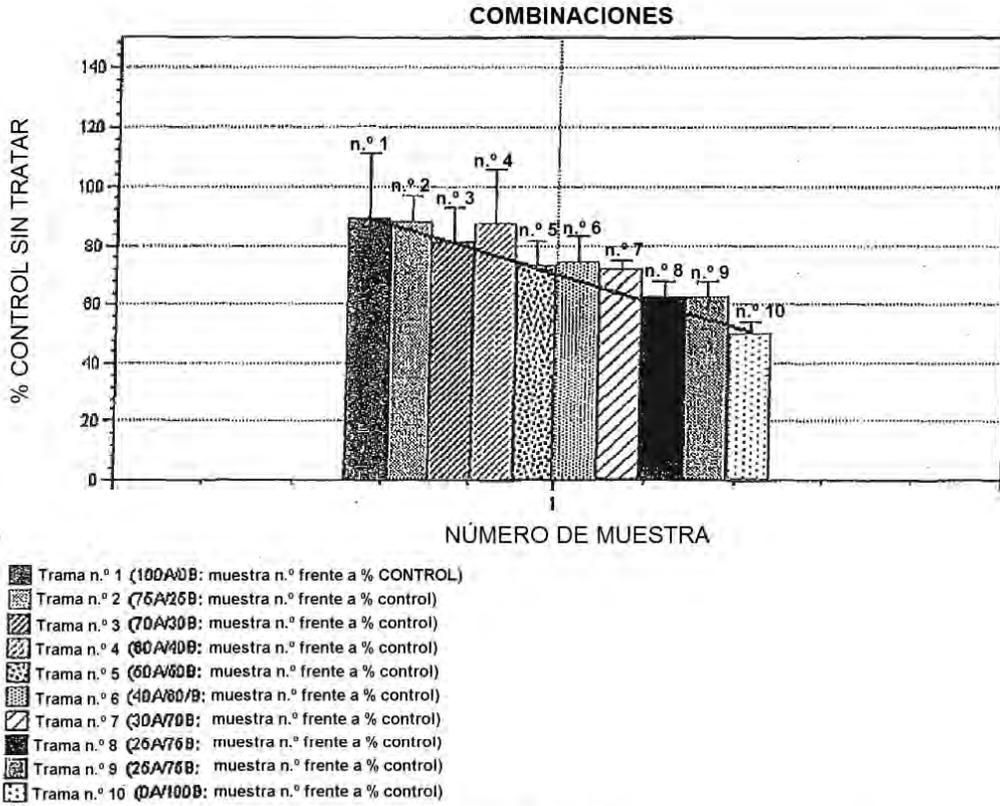


Figura 49A

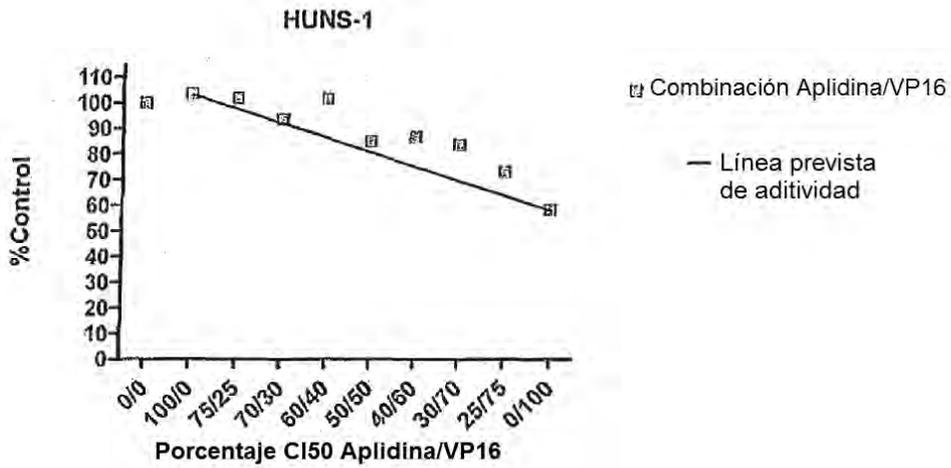


Figura 49B

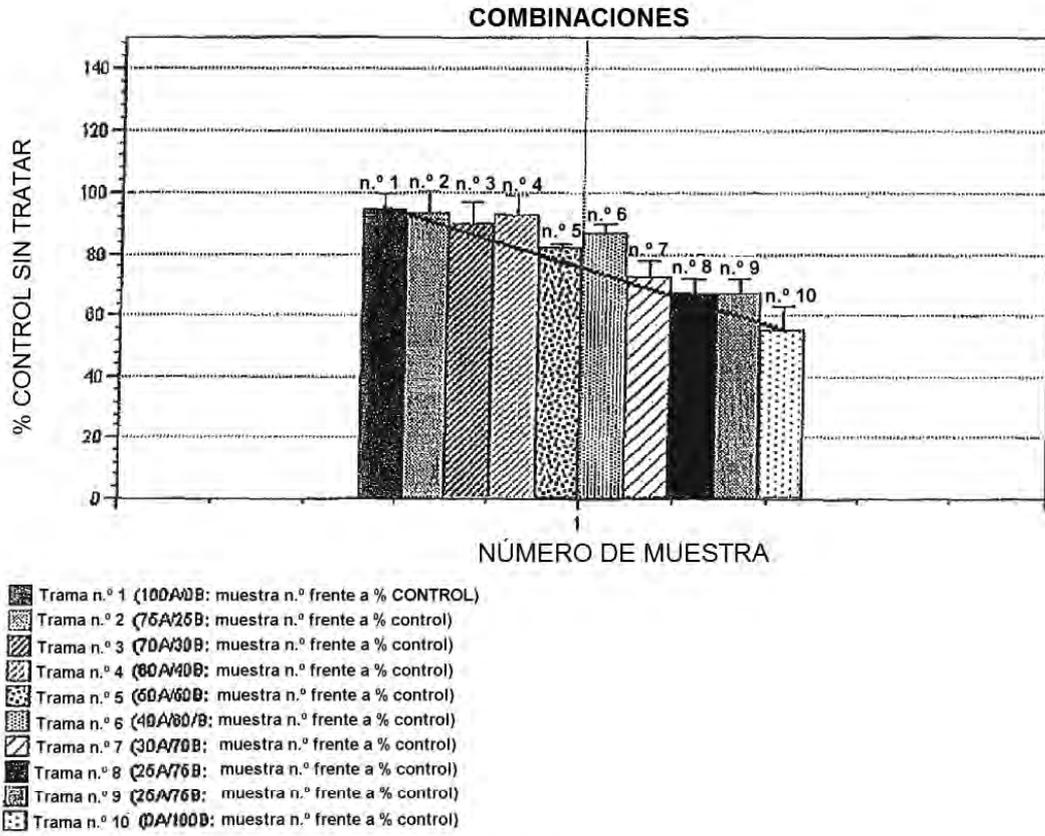


Figura 50A

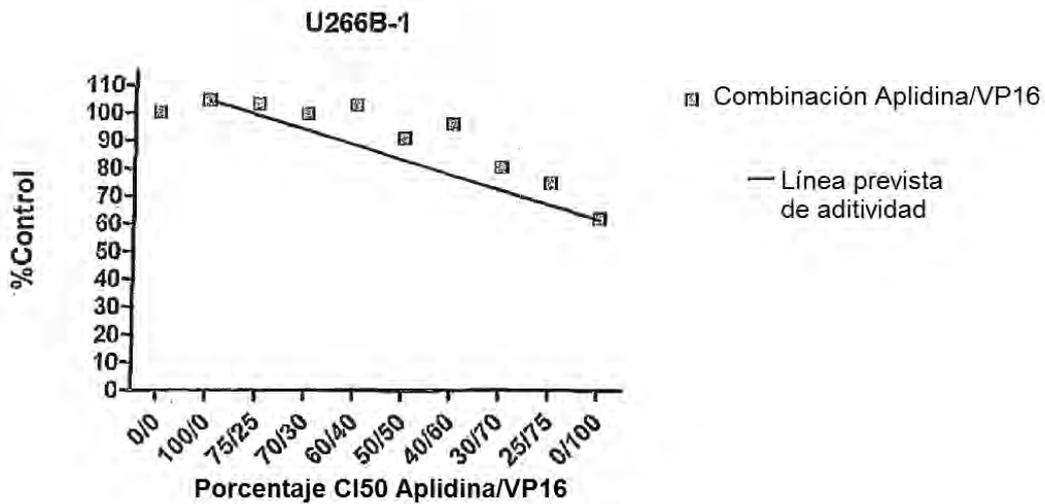


Figura 50B

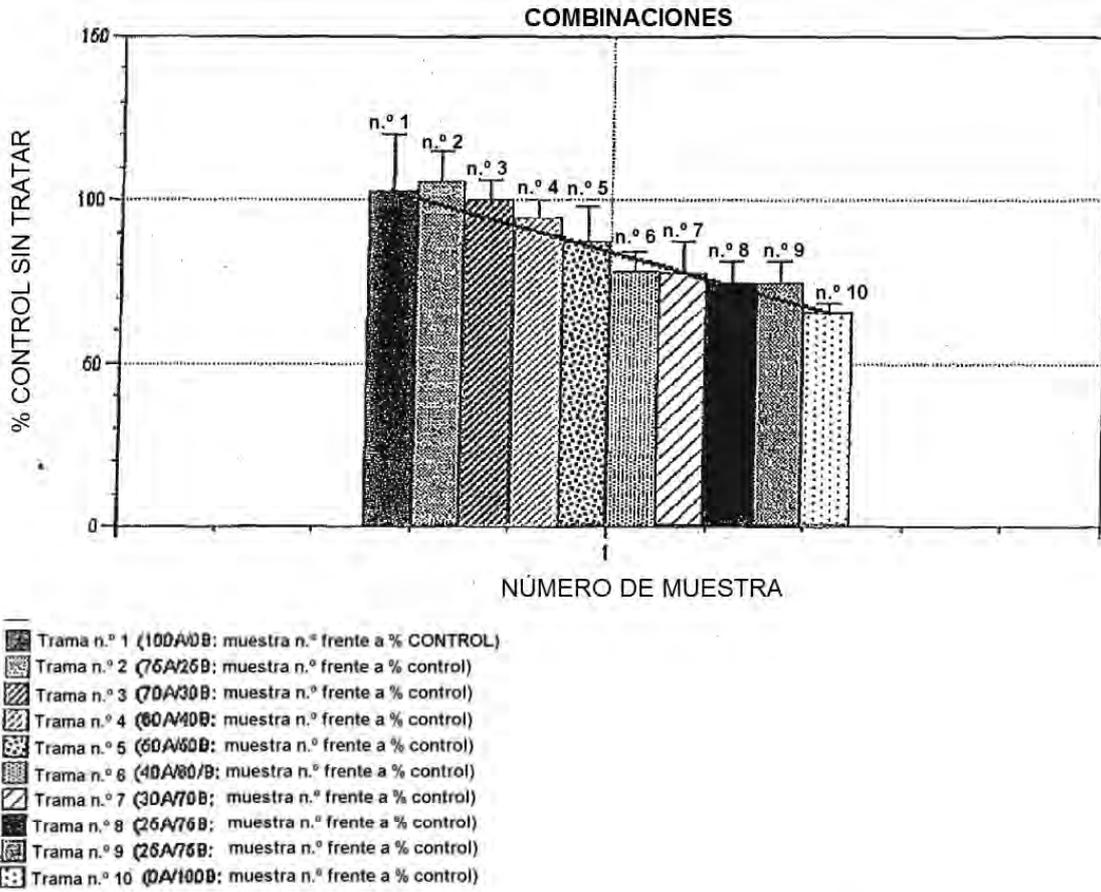


Figura 51A

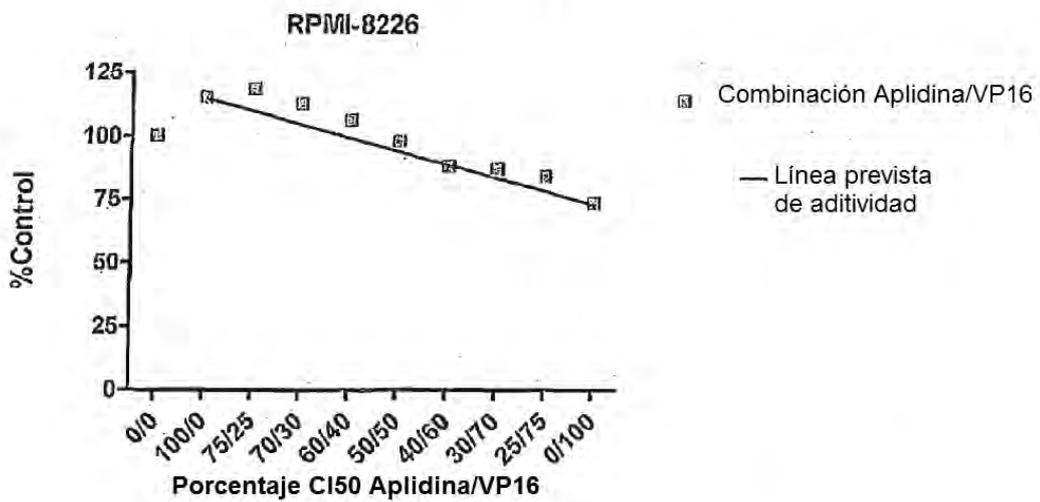


Figura 51B

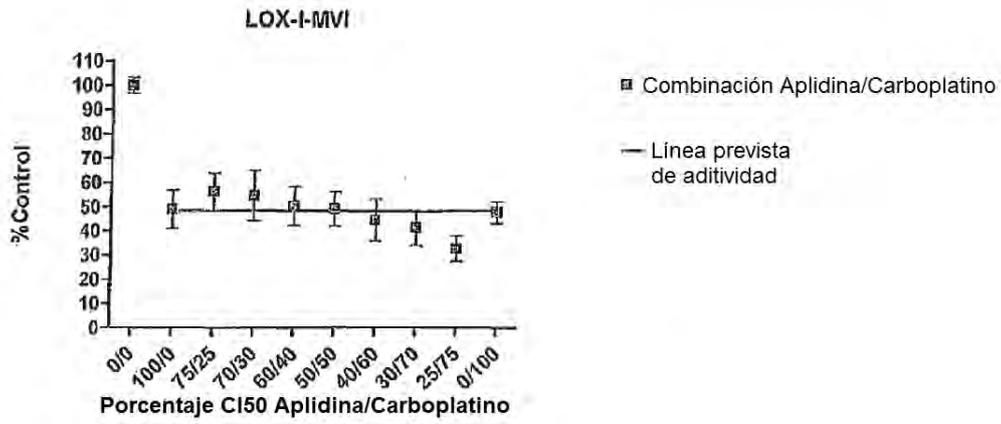


Figura 52

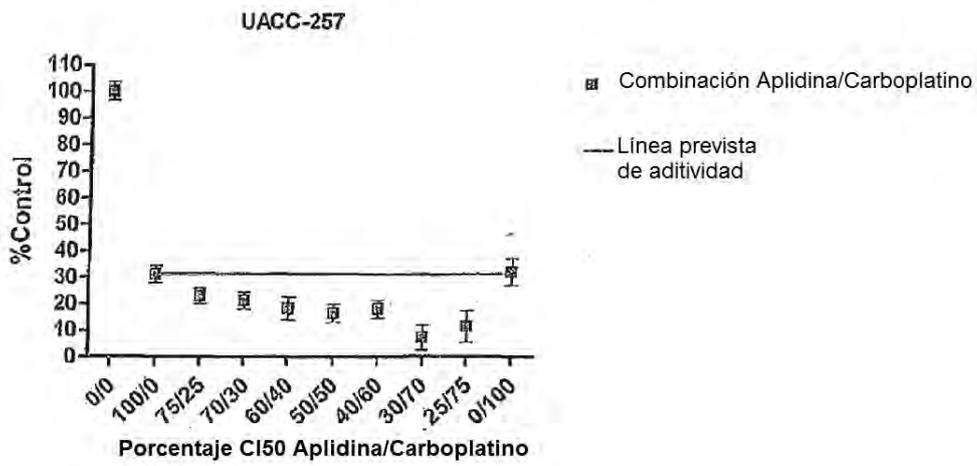


Figura 53

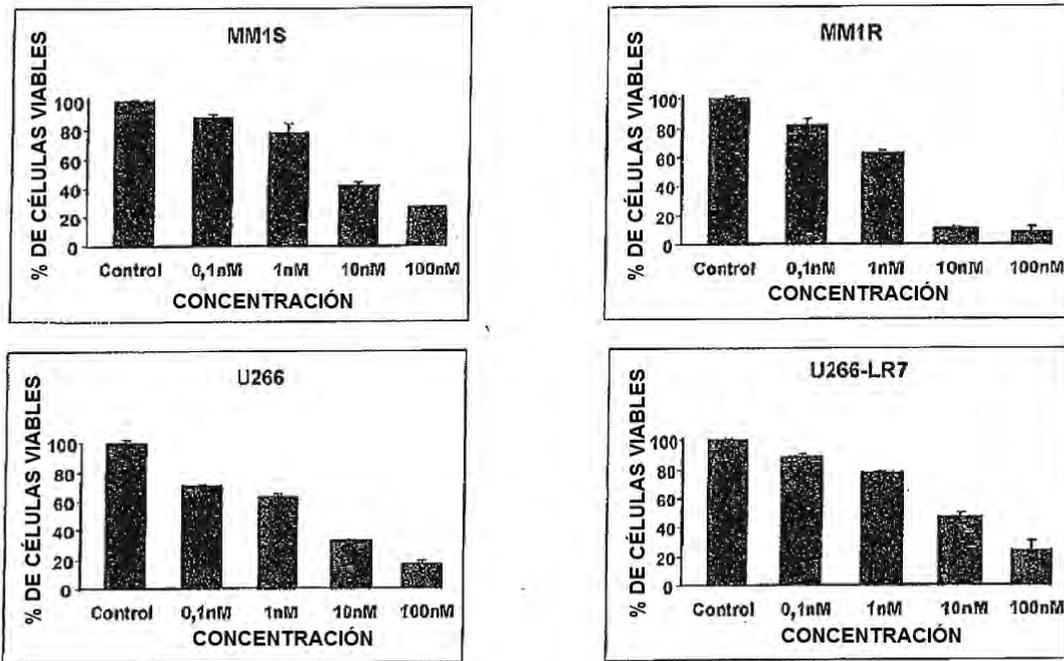


Figura 54

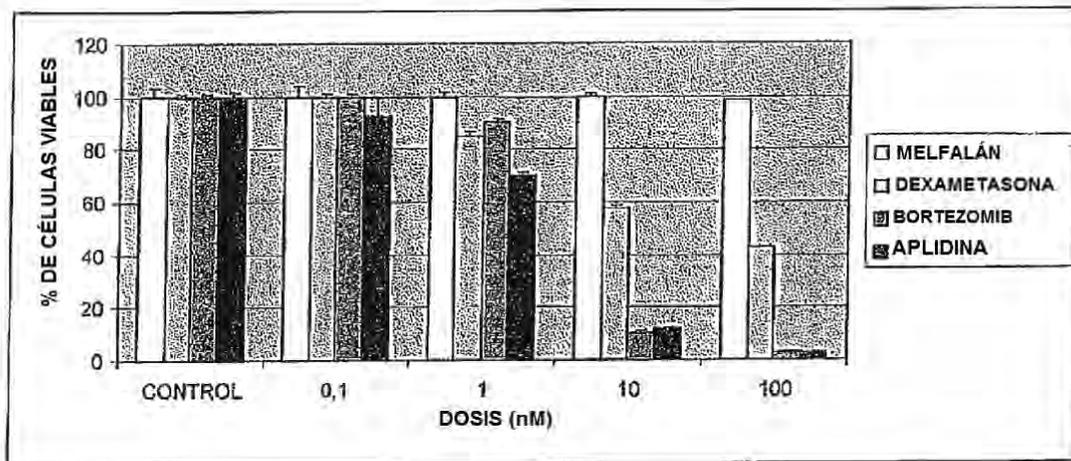
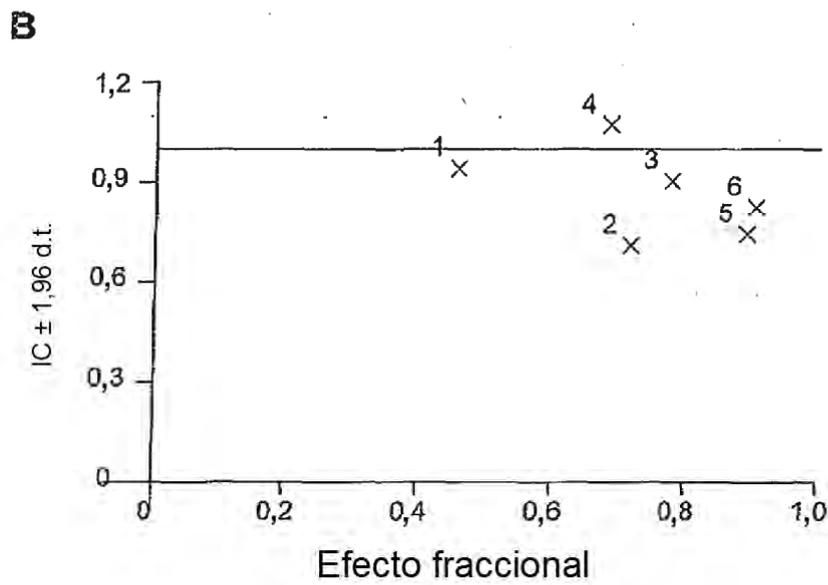
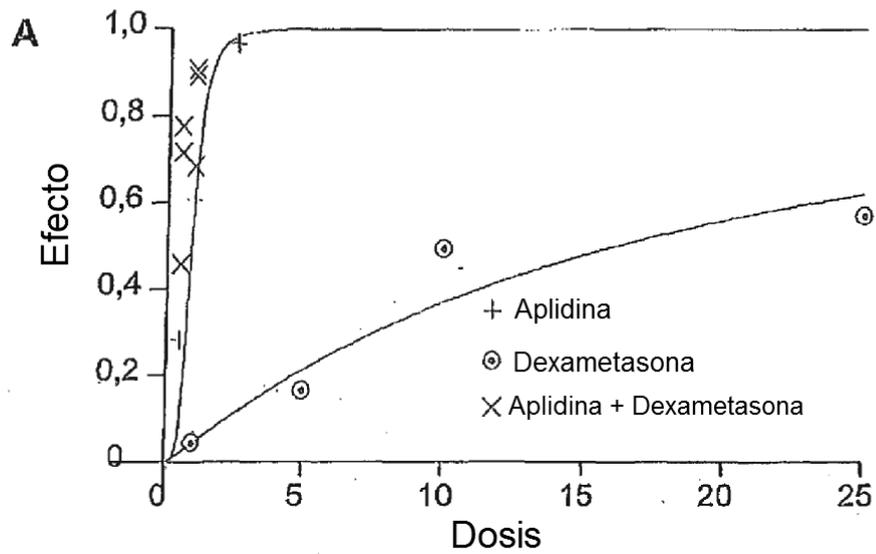


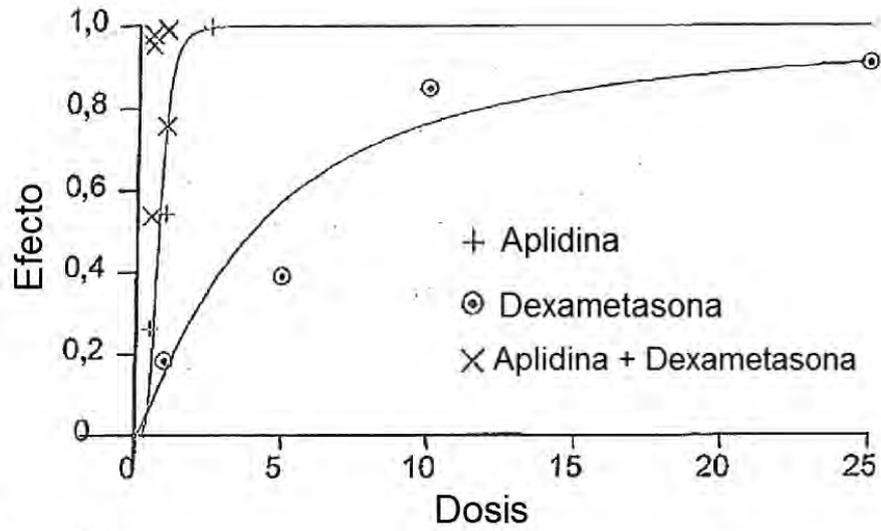
Figura 55



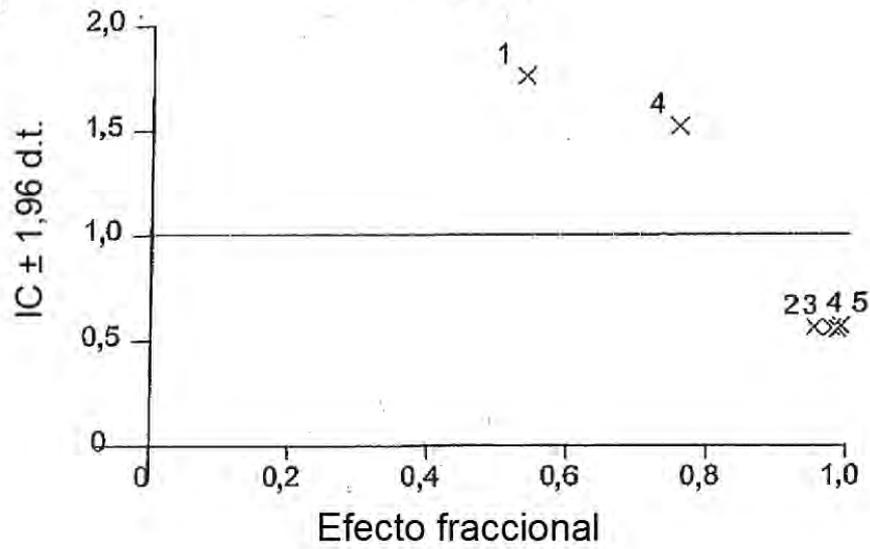
	Aplidina (nM)	Dexa (nM)	Fa	IC
1	0,5	5	0,4597	0,943
2	0,5	10	0,7176	0,710
3	0,5	25	0,7786	0,906
4	1	5	0,6854	1,074
5	1	10	0,8933	0,744
6	1	25	0,907	0,827

Figura 56

A

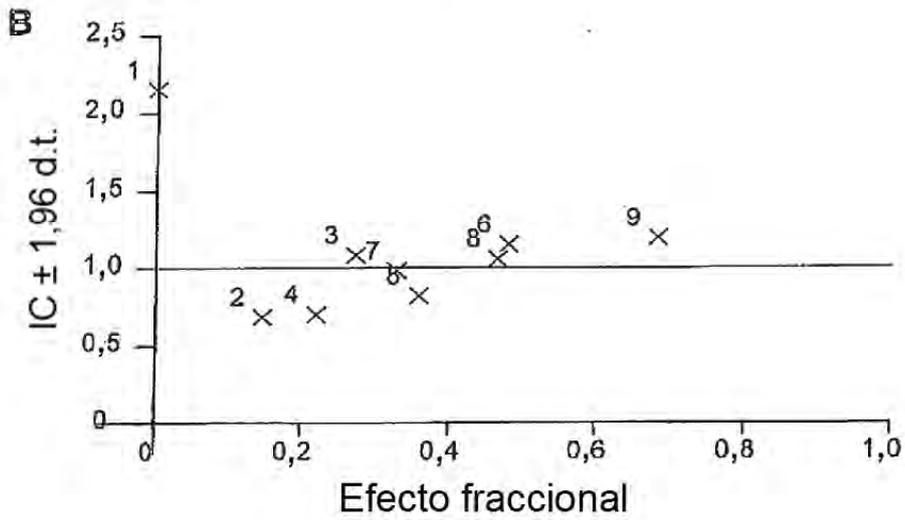
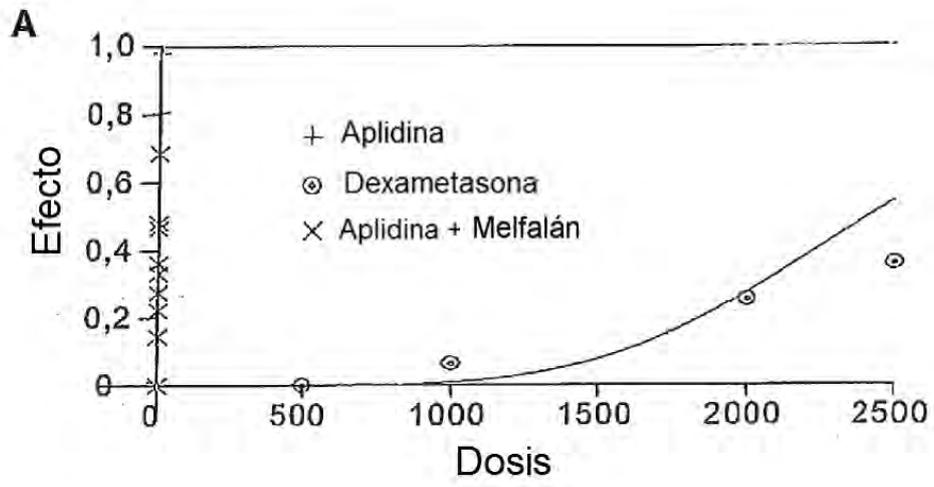


B



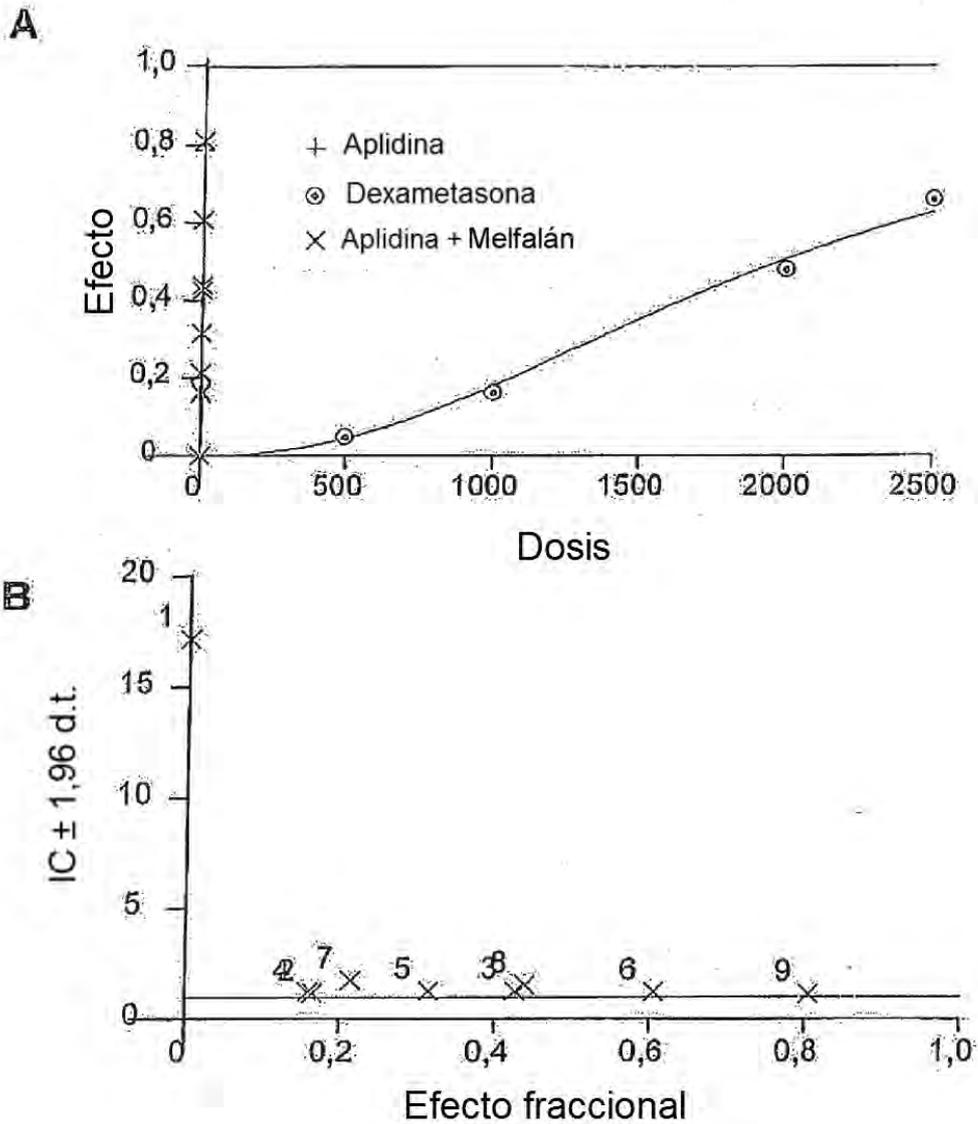
	Aplidina (nM)	Dexa (nM)	Fa	IC
1	0,5	5	0,5368	1,761
2	0,5	10	0,9535	0,559
3	0,5	25	0,9801	0,554
4	1	5	0,7578	1,523
5	1	10	0,9886	0,553
6	1	25	0,9925	0,565

Figura 57



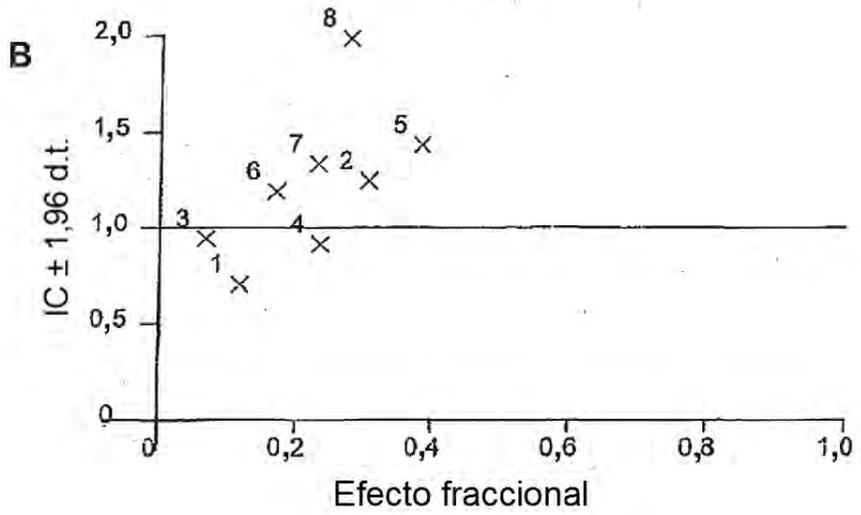
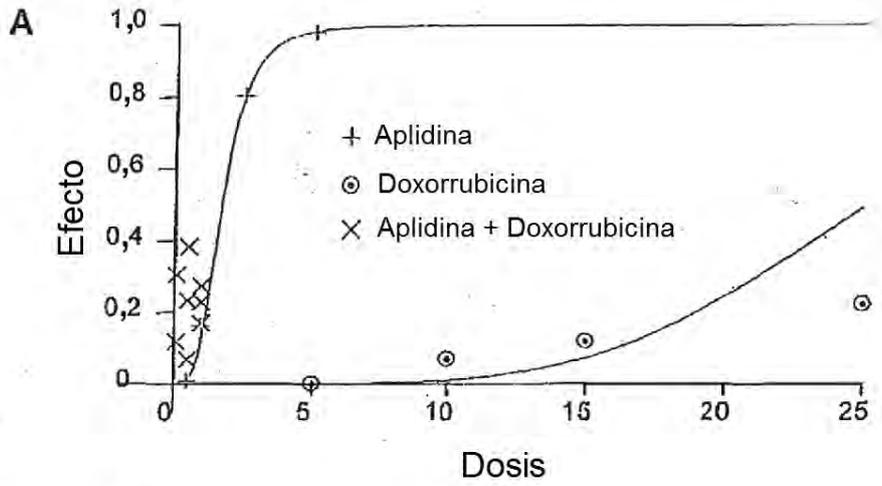
	Apl (nM)	Mel (nM)	Fa	IC
1	0,1	500	0,0001	2,152
2	0,1	1000	0,1471	0,683
3	0,1	2000	0,2745	1,079
4	0,5	500	0,2224	0,701
5	0,5	1000	0,3605	0,820
6	0,5	2000	0,4812	1,148
7	1	500	0,3312	0,981
8	1	1000	0,4662	1,053
9	1	2000	0,6854	1,191

Figura 58



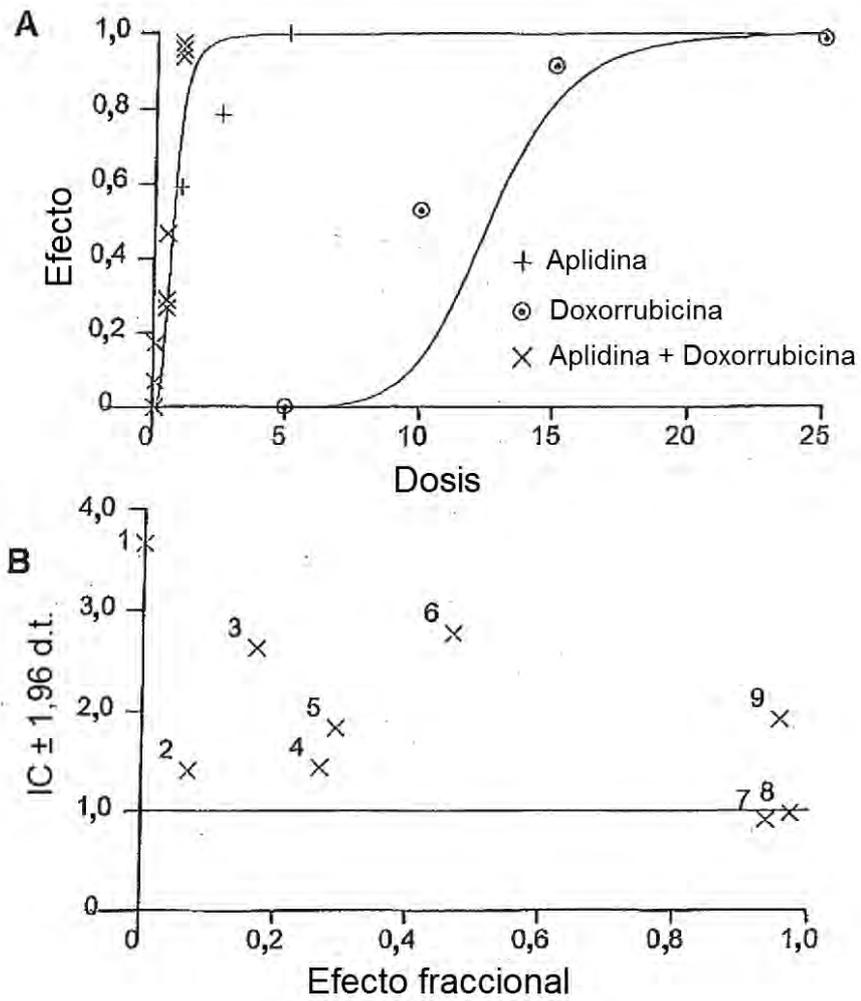
	Apli (nM)	Mel (nM)	Fa	IC
1	0,1	500	0,0001	17,159
2	0,1	1000	0,165	1,187
3	0,1	2000	0,4258	1,252
4	0,5	500	0,1587	1,236
5	0,5	1000	0,3146	1,270
6	0,5	2000	0,6058	1,233
7	1	500	0,2143	1,724
8	1	1000	0,4388	1,524
9	1	2000	0,807	1,144

Figura 59



	Apli (nM)	Doxo (nM)	Fa	IC
1	0,1	10	0,1175	0,702
2	0,1	25	0,3043	1,249
3	0,5	5	0,0691	0,945
4	0,5	10	0,2338	0,918
5	0,5	25	0,3826	1,433
6	1	5	0,1705	1,193
7	1	10	0,2298	1,337
8	1	25	0,2751	1,985

Figura 60



	Apli (nM)	Doxo (nM)	Fa	IC
1	0,1	5	0,0001	3,677
2	0,1	10	0,071	1,398
3	0,1	25	0,1718	2,629
4	0,5	5	0,2682	1,431
5	0,5	10	0,2905	1,834
6	0,5	25	0,4664	2,770
7	1	5	0,9391	0,905
8	1	10	0,9752	0,977
9	1	25	0,9576	1,921

Figura 61

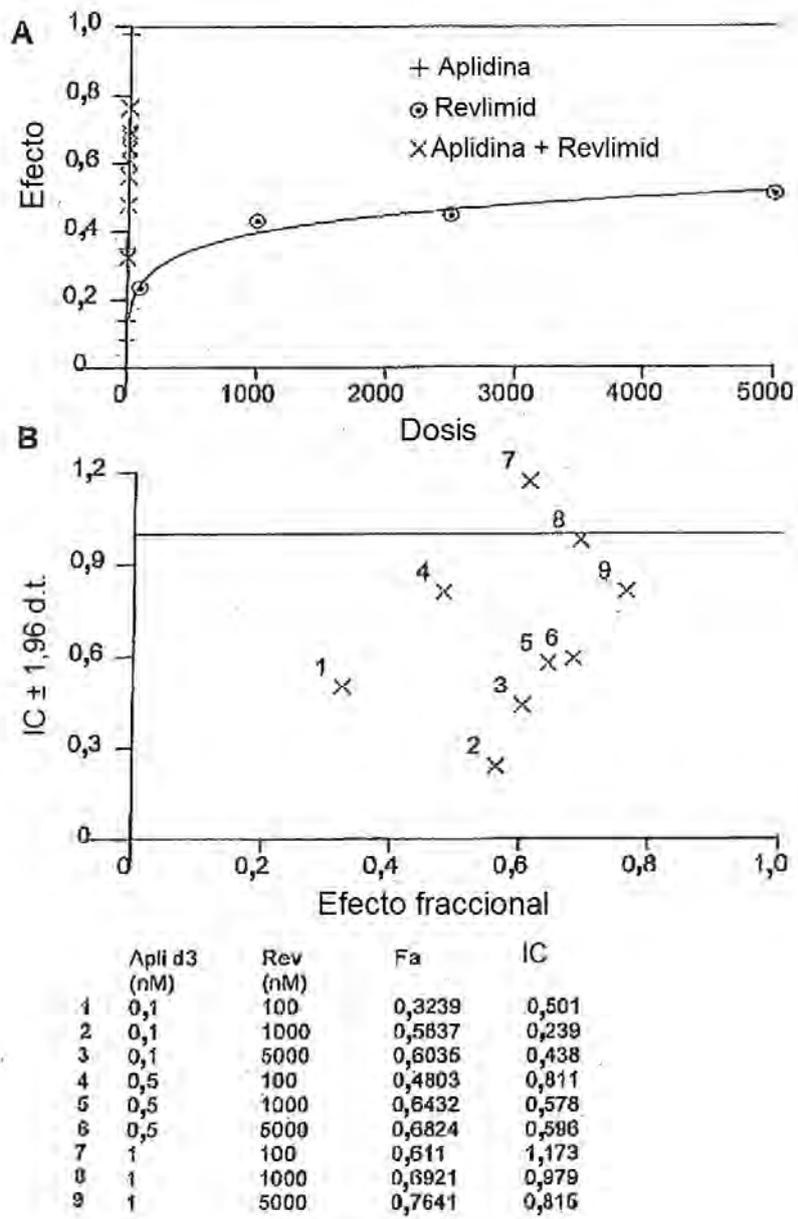


Figura 62

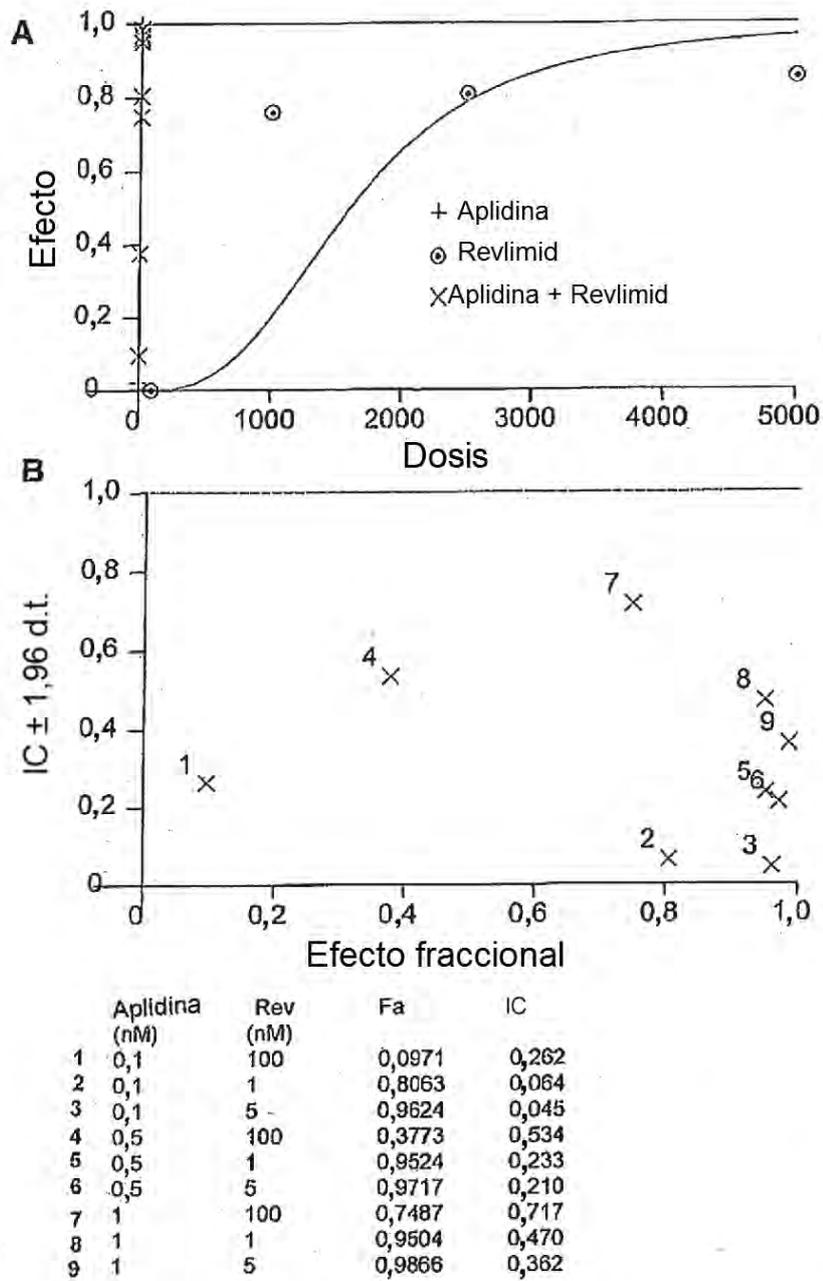
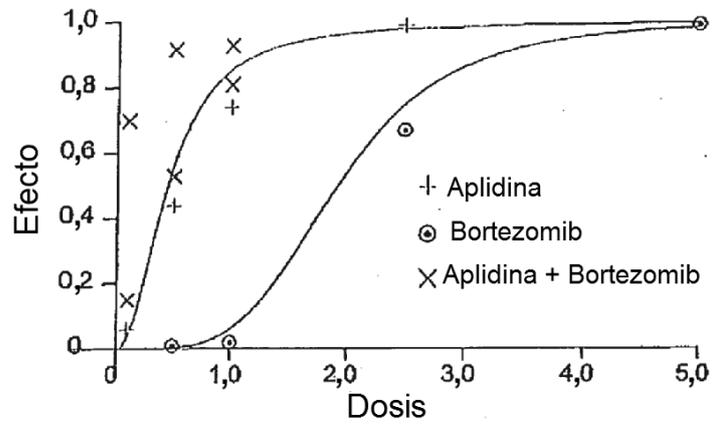
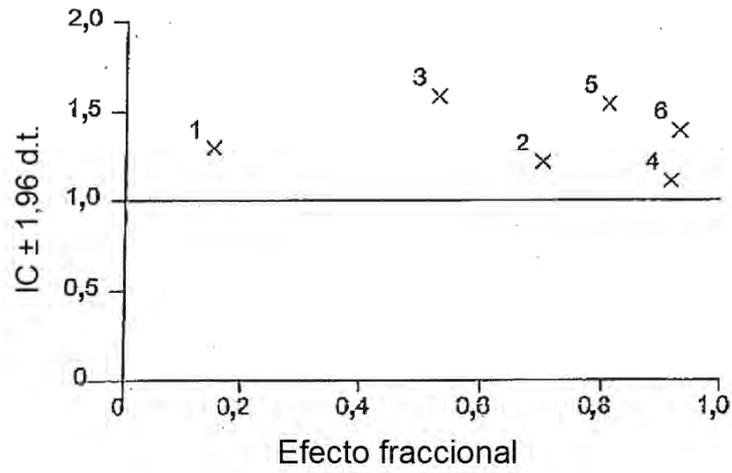


Figura 63

A

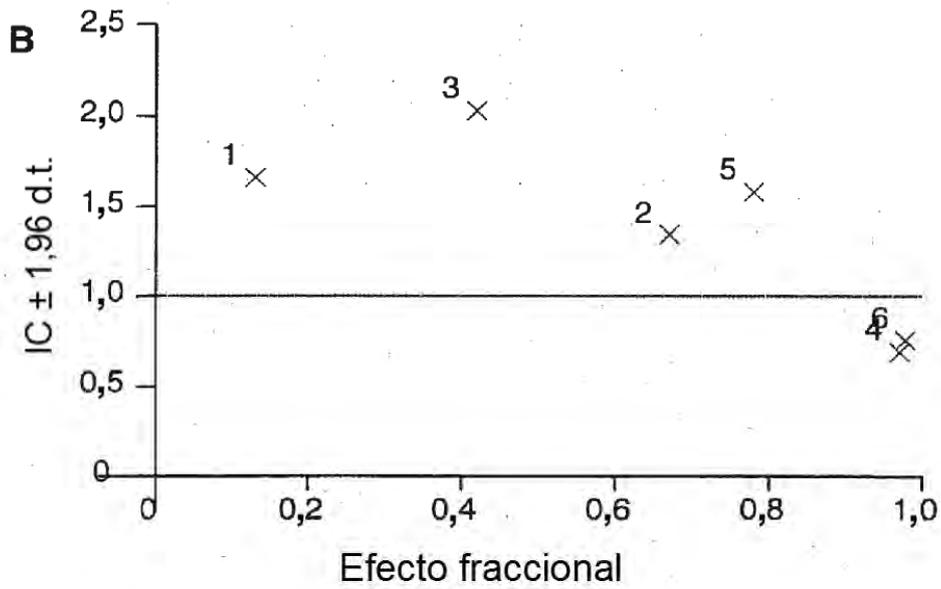
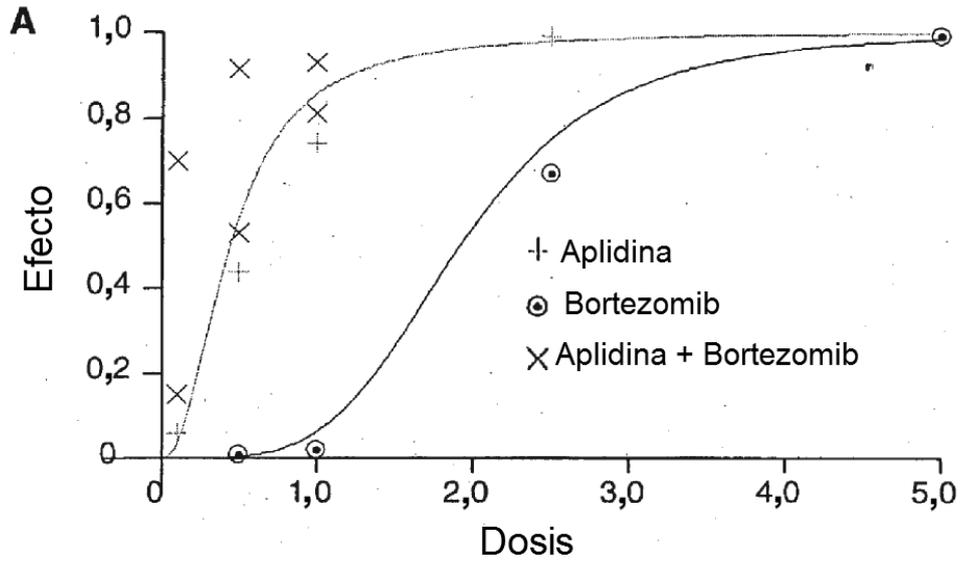


B



	Apli (nM)	Bortz (nM)	Fa	IC
1	0,1	1	0,15	1,298
2	0,1	2,5	0,7	1,217
3	0,5	1	0,53	1,585
4	0,5	2,5	0,917	1,108
5	1	1	0,81	1,539
6	1	2,5	0,93	1,393

Figura 64



	Apli (nM)	Bortz (nM)	Fa	IC
1	0,1	1	0,13	1,659
2	0,1	2,5	0,67	1,339
3	0,5	1	0,42	2,030
4	0,5	2,5	0,972	0,691
5	1	1	0,78	1,578
6	1	2,5	0,98	0,753

Figura 65

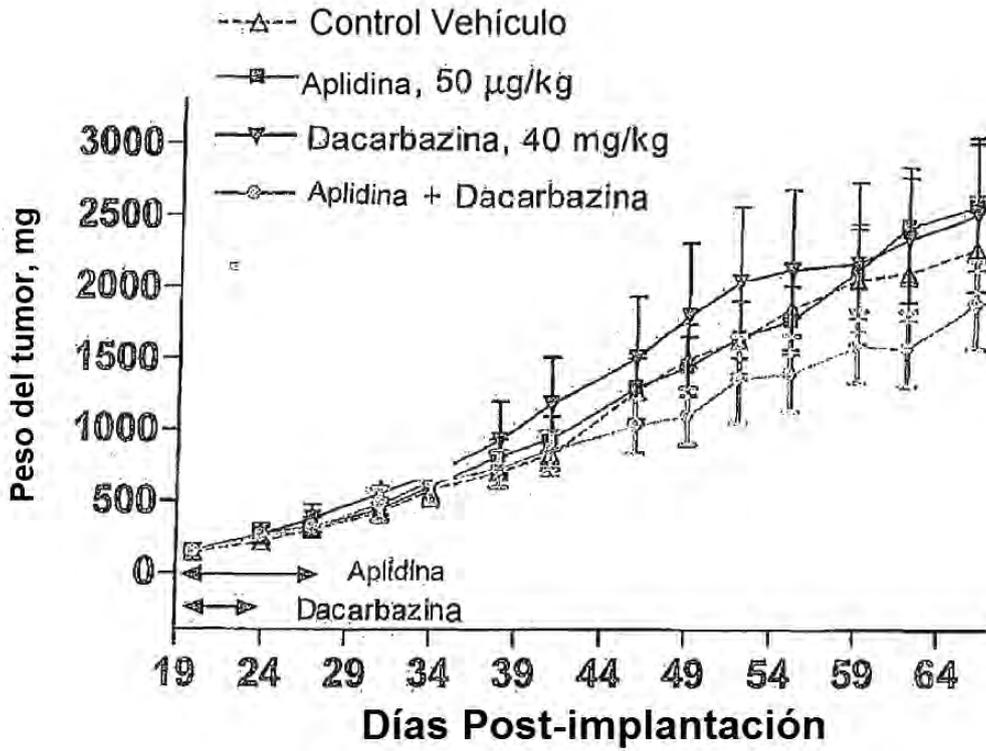


Figura 66

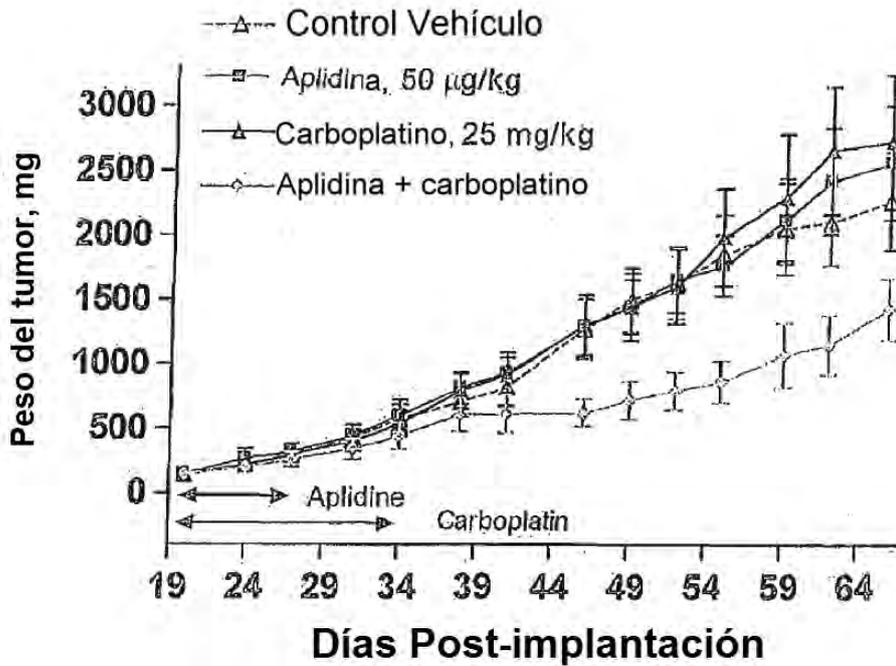


Figura 67

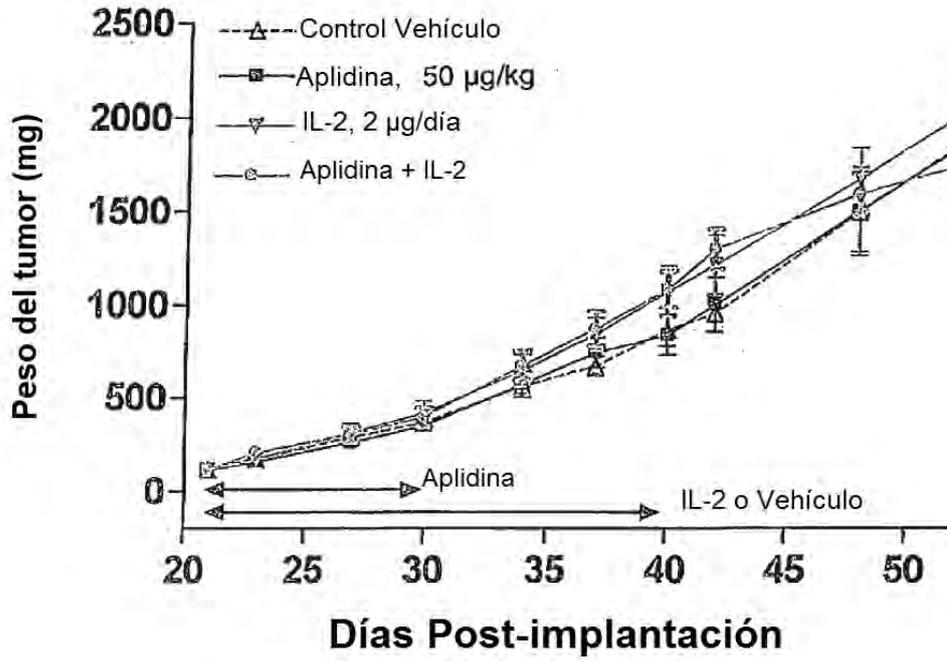


Figura 68

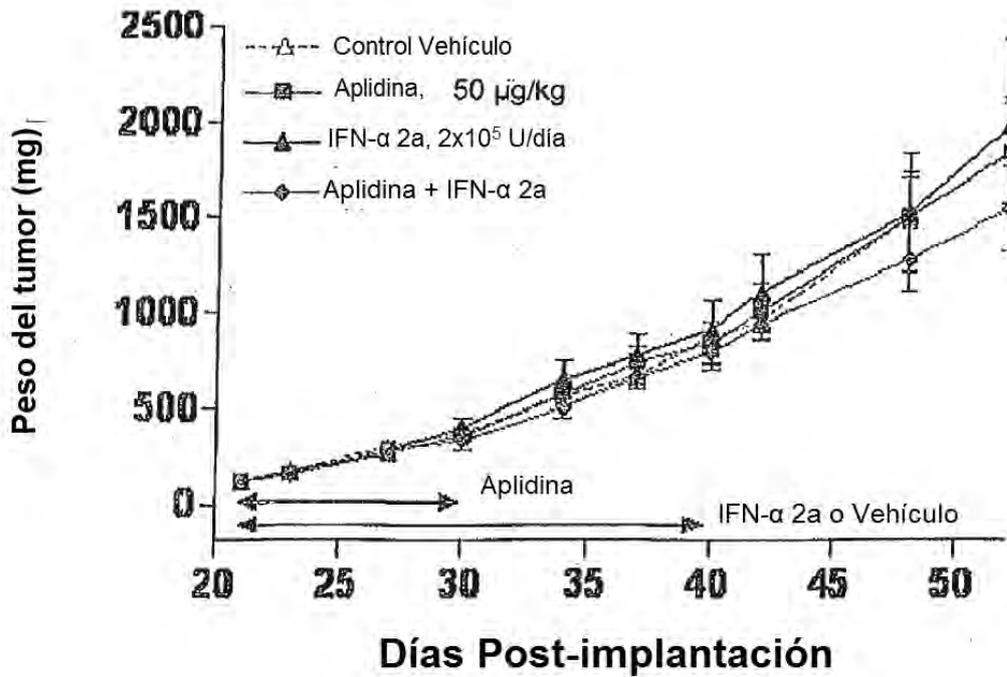


Figura 69

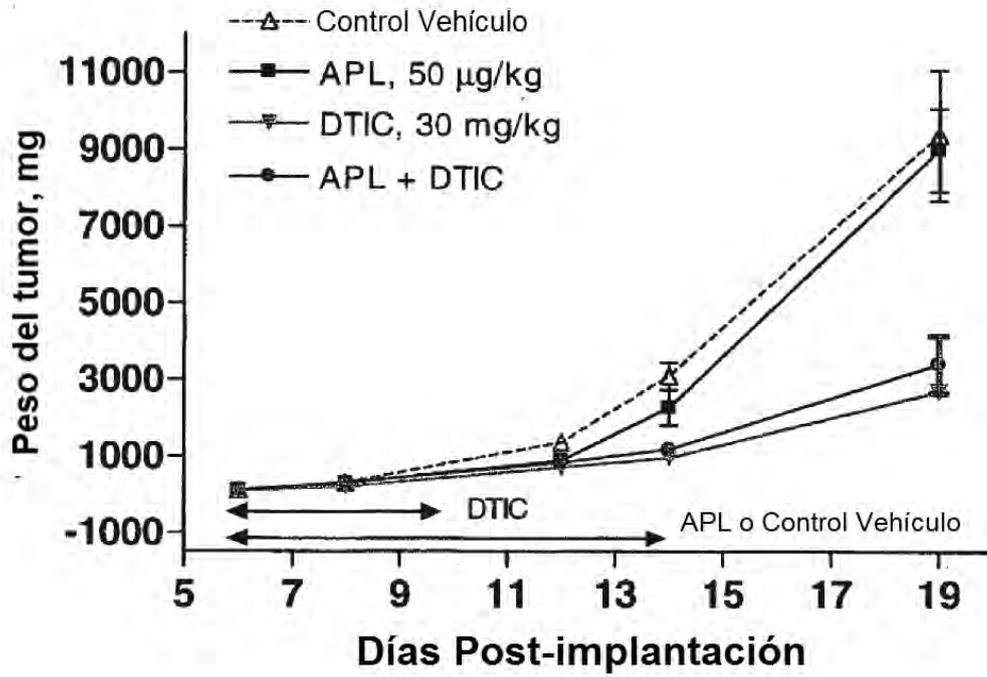


Figura 70

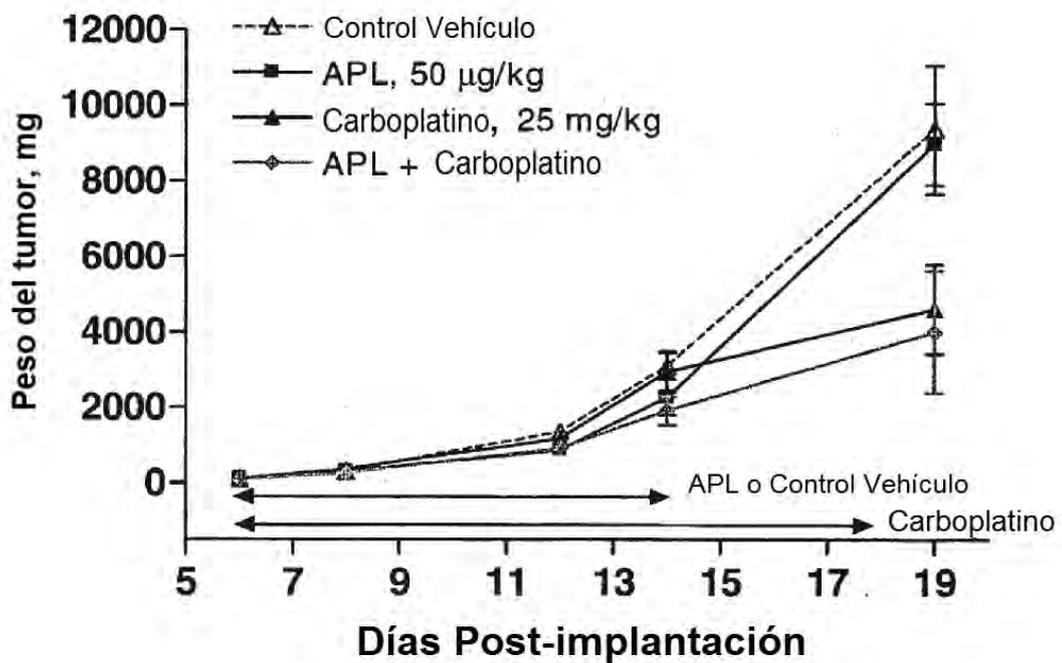


Figura 71

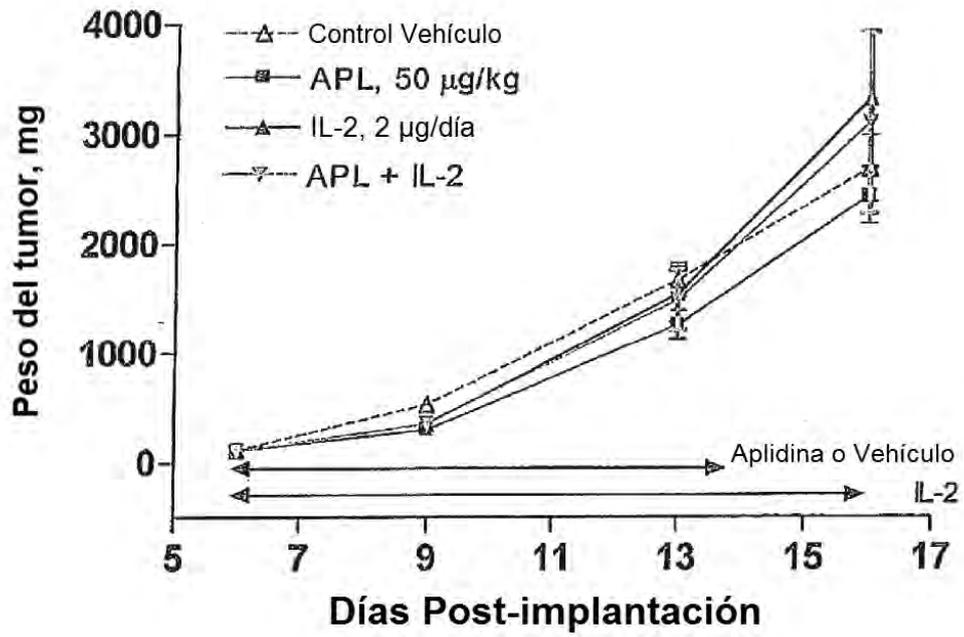


Figura 72

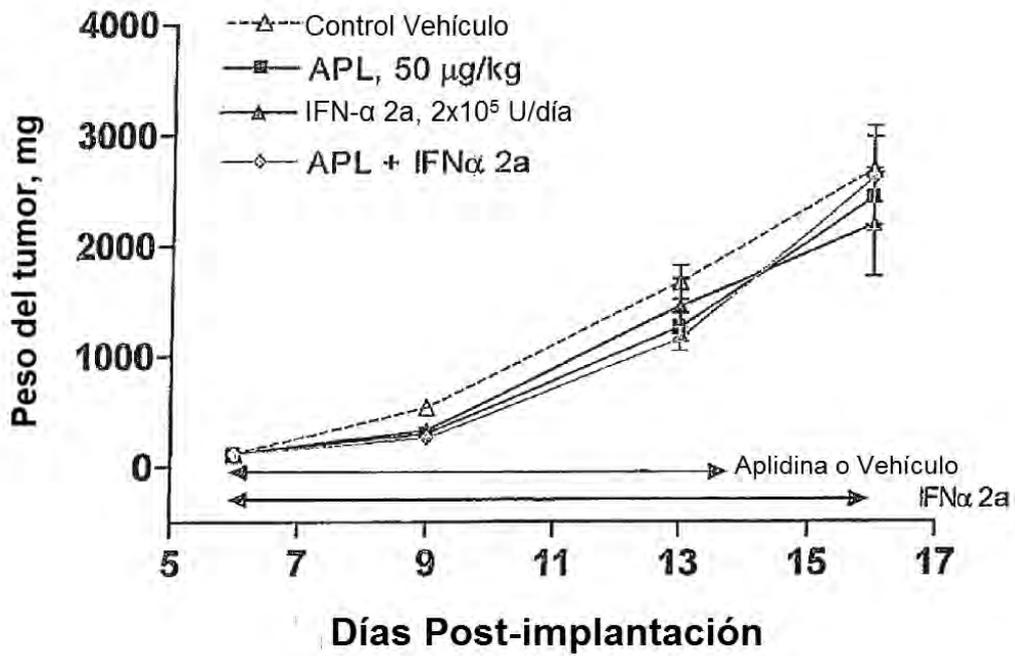


Figura 73

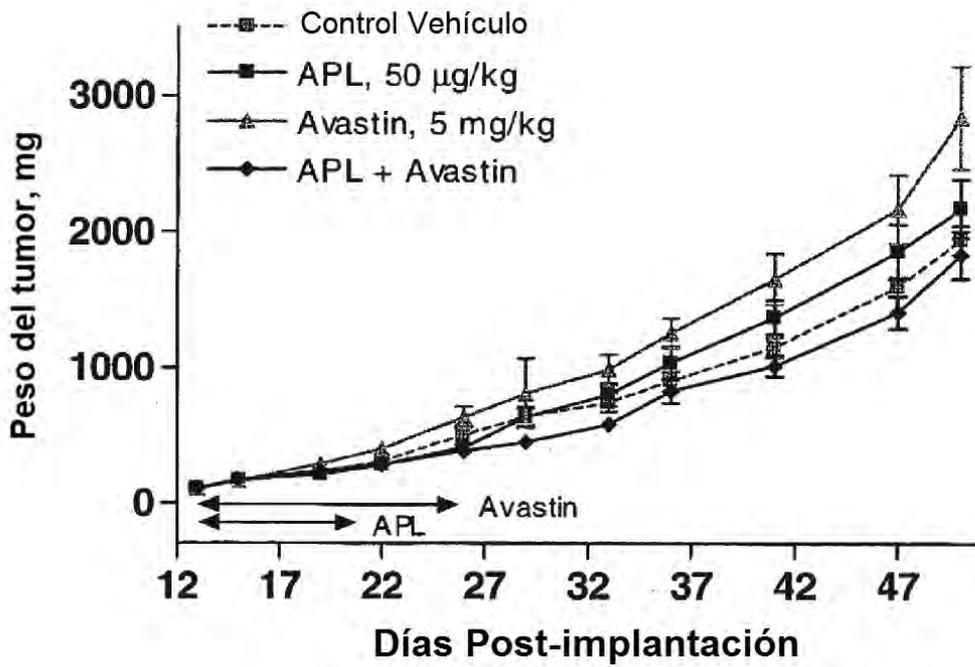


Figura 74

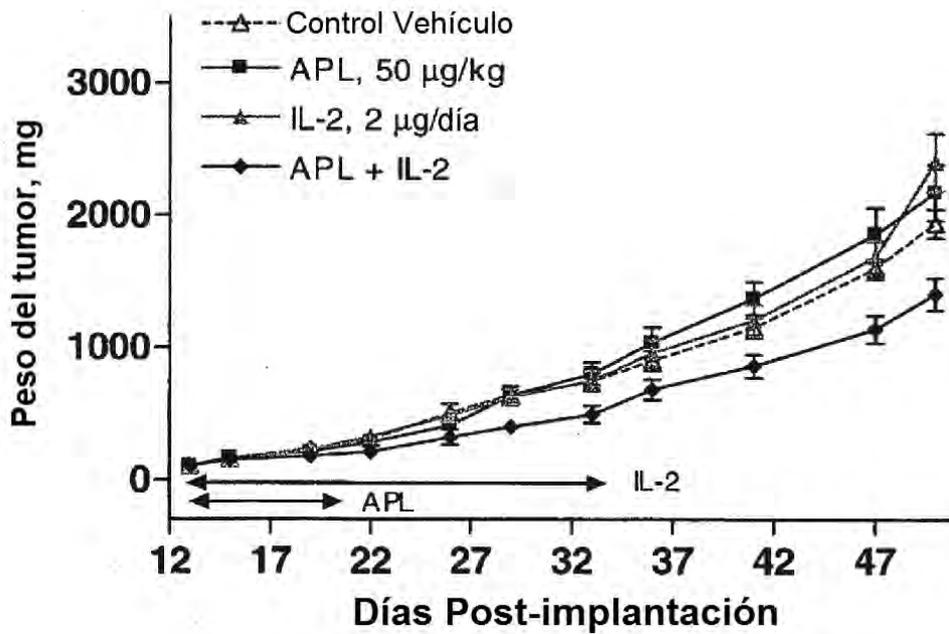


Figura 75

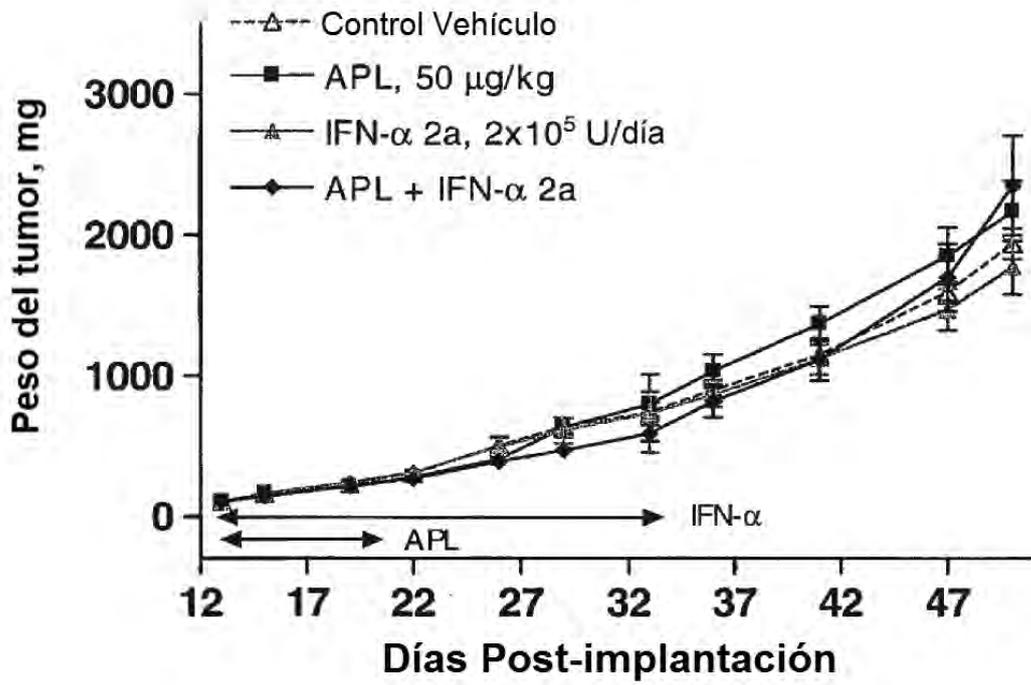


Figura 76

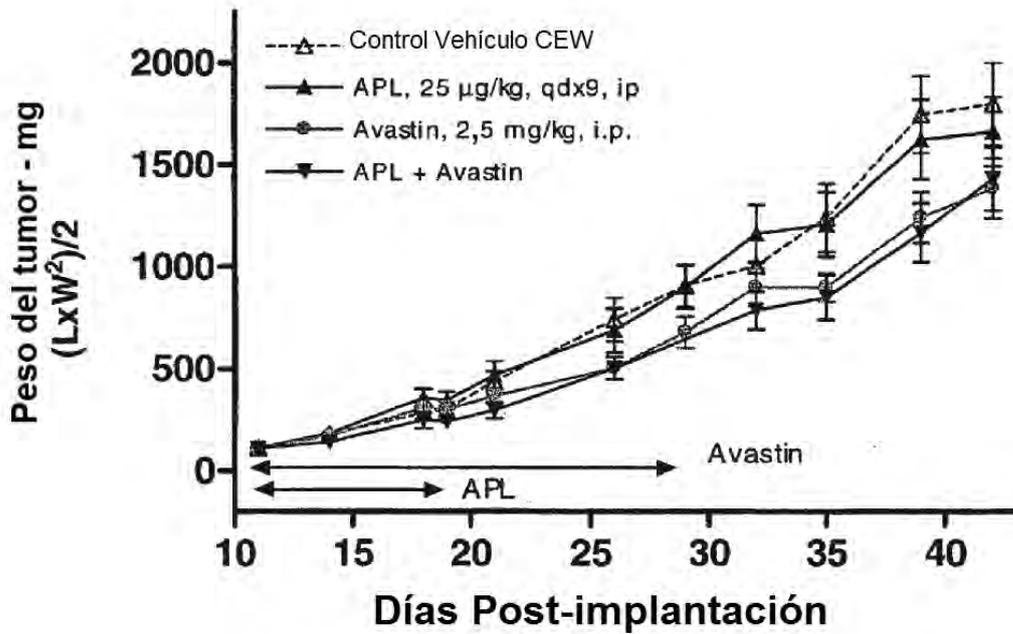


Figura 77

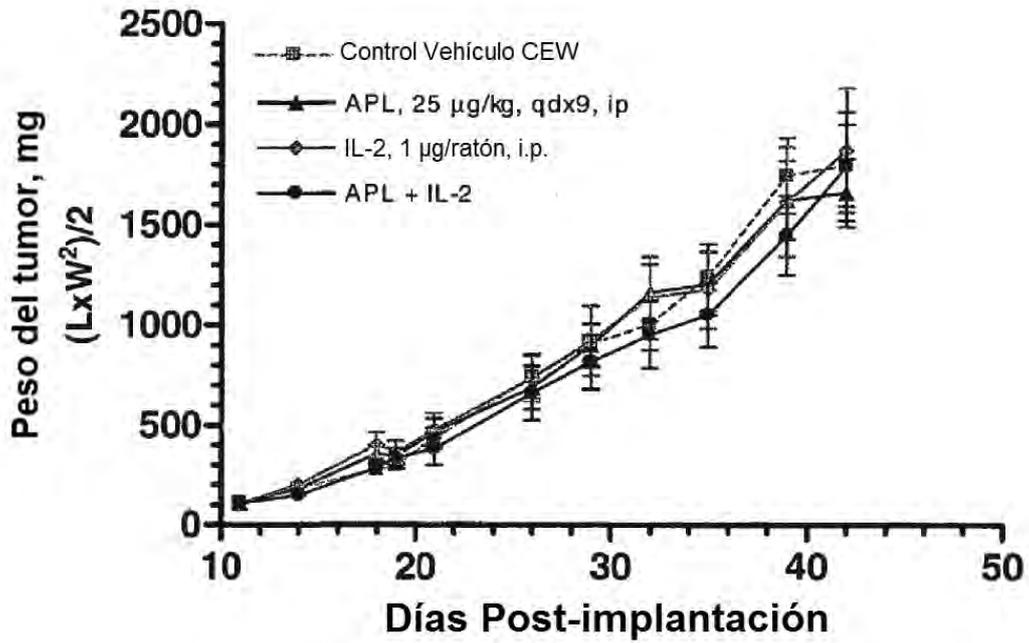


Figura 78

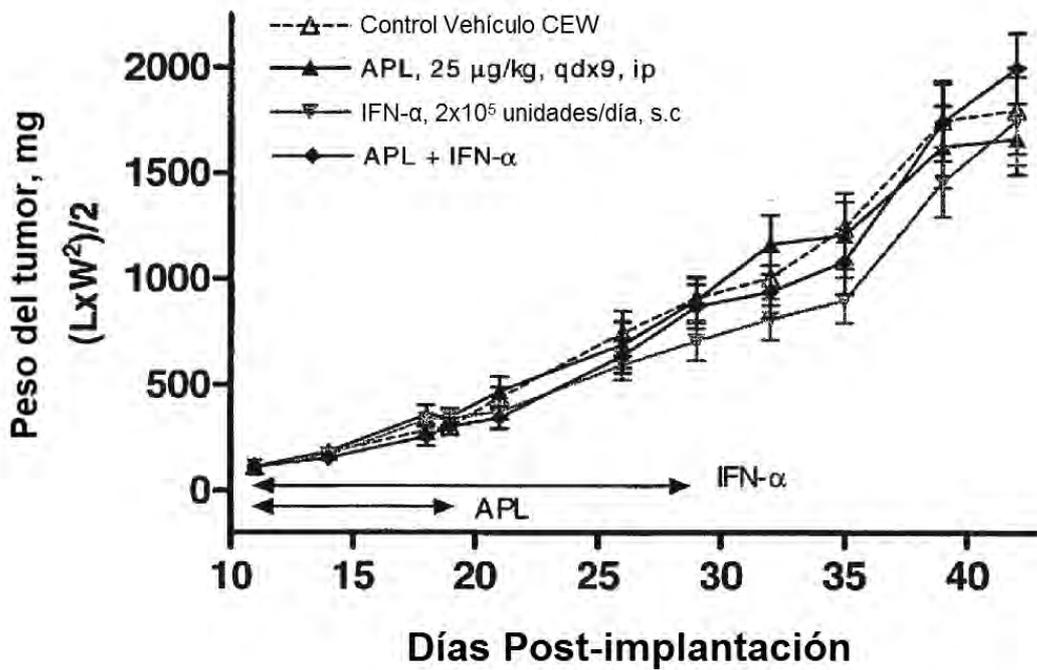


Figura 79

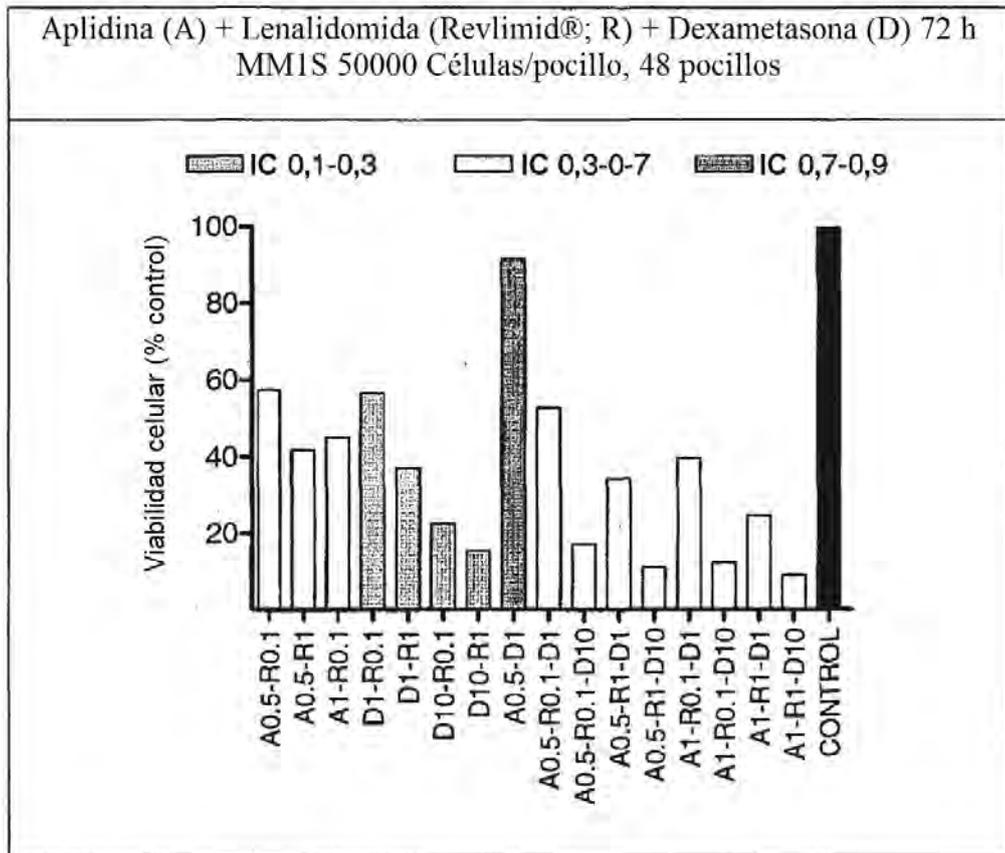


Figura 80

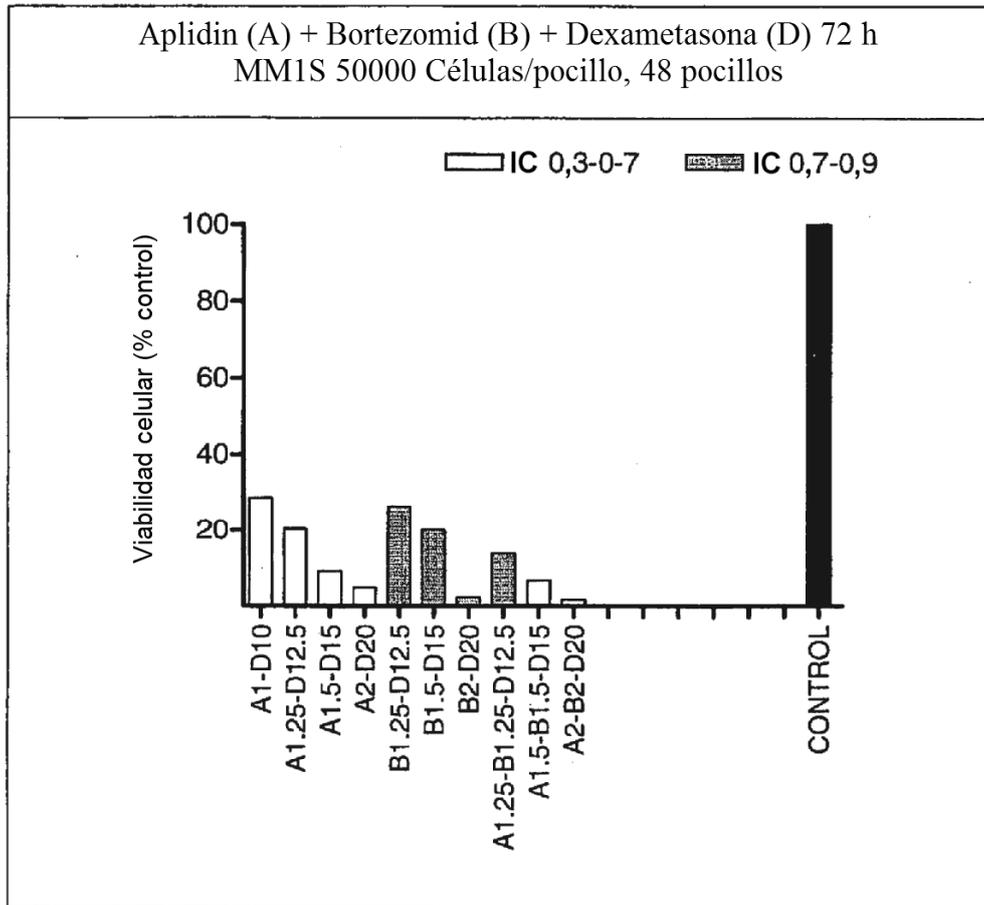


Figura 81

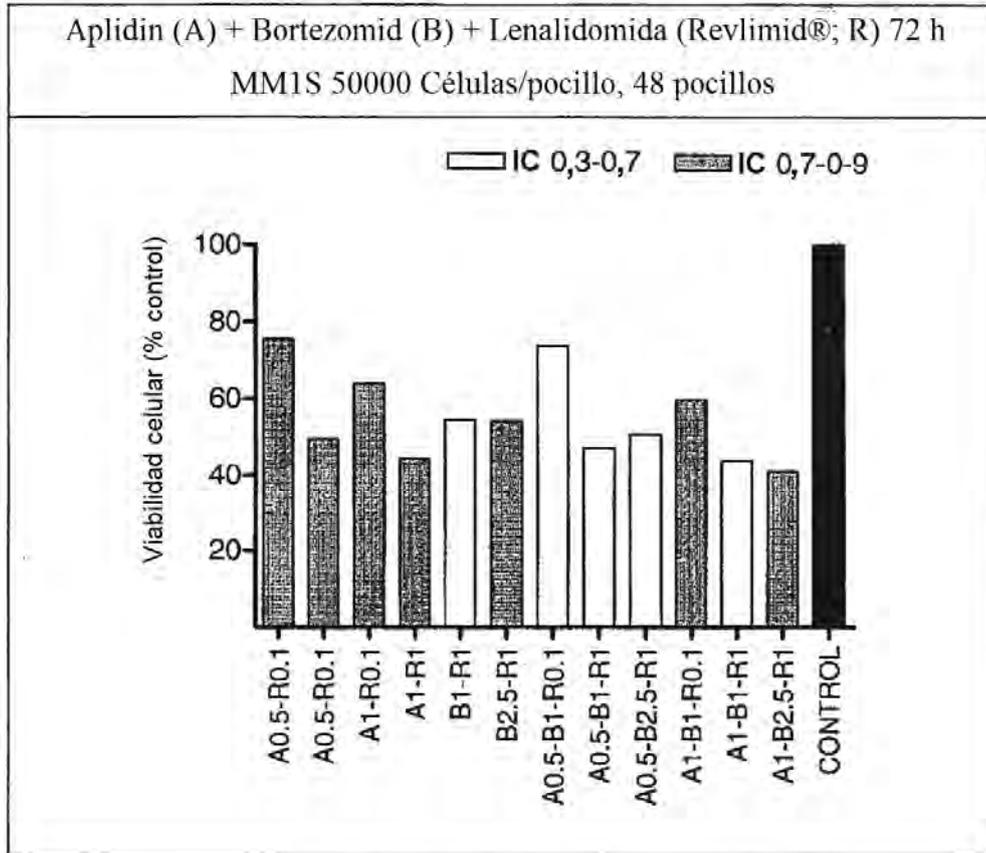


Figura 82

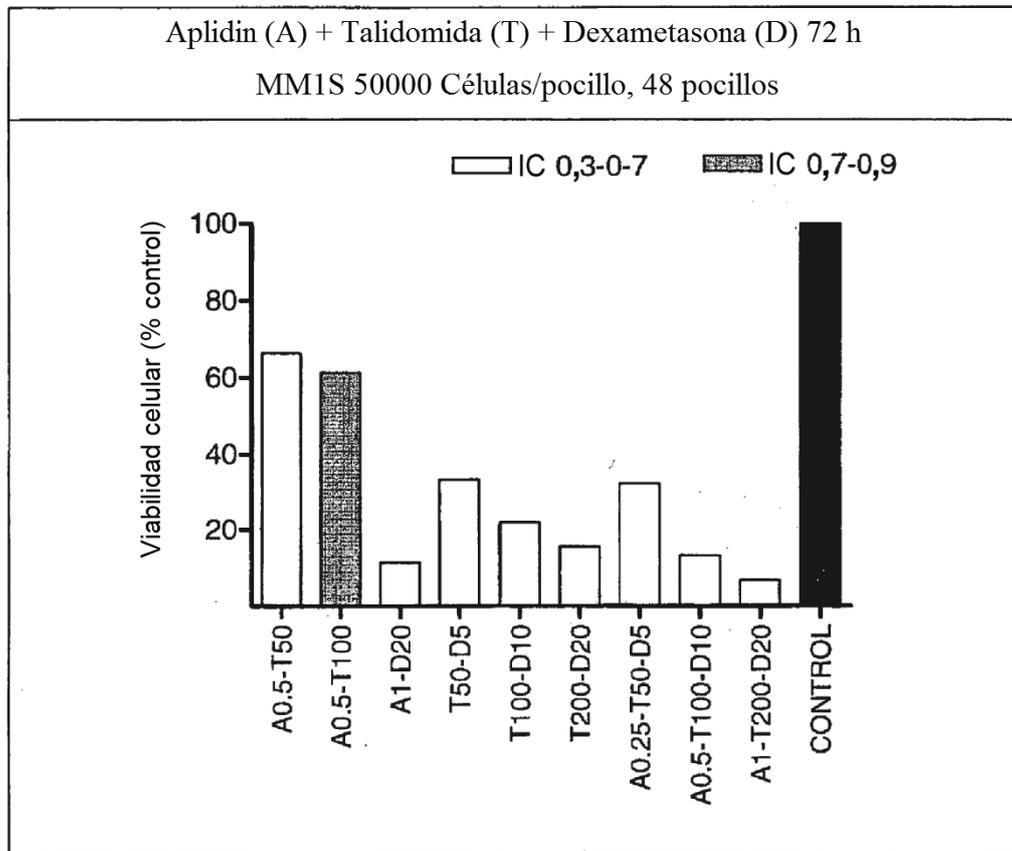


Figura 83

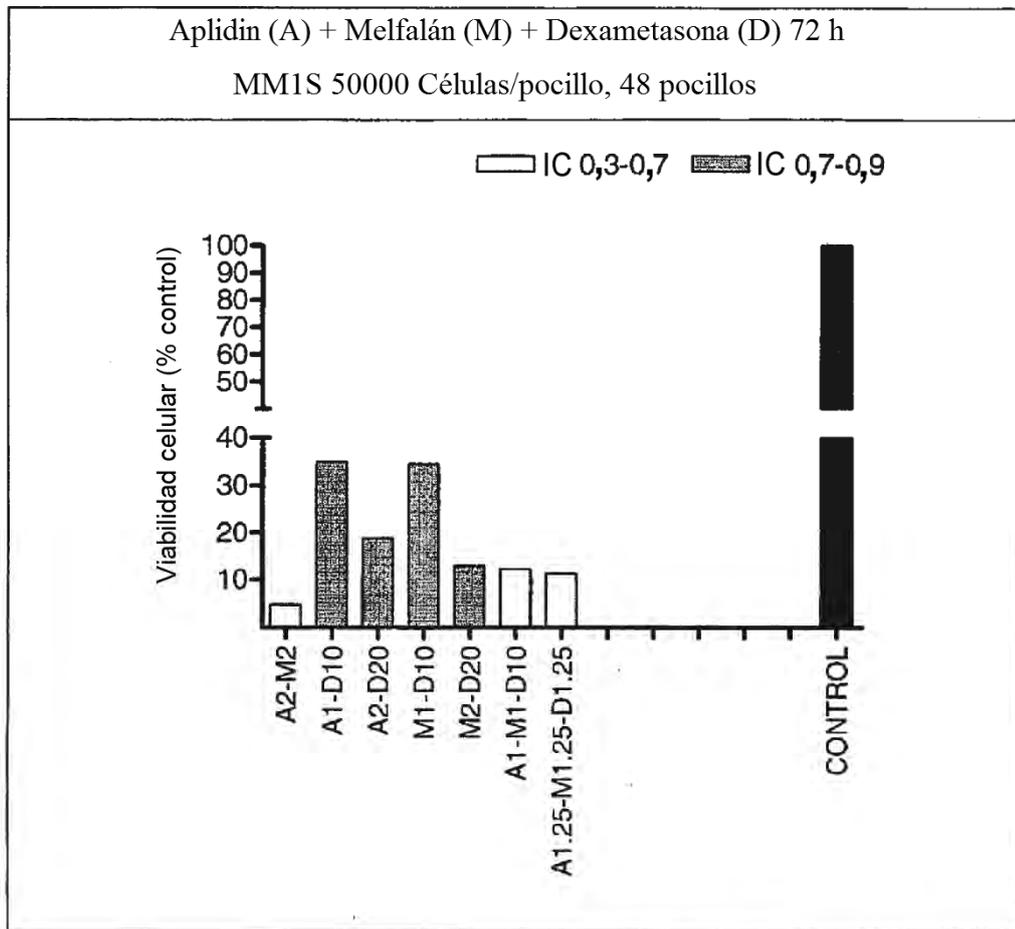


Figura 84

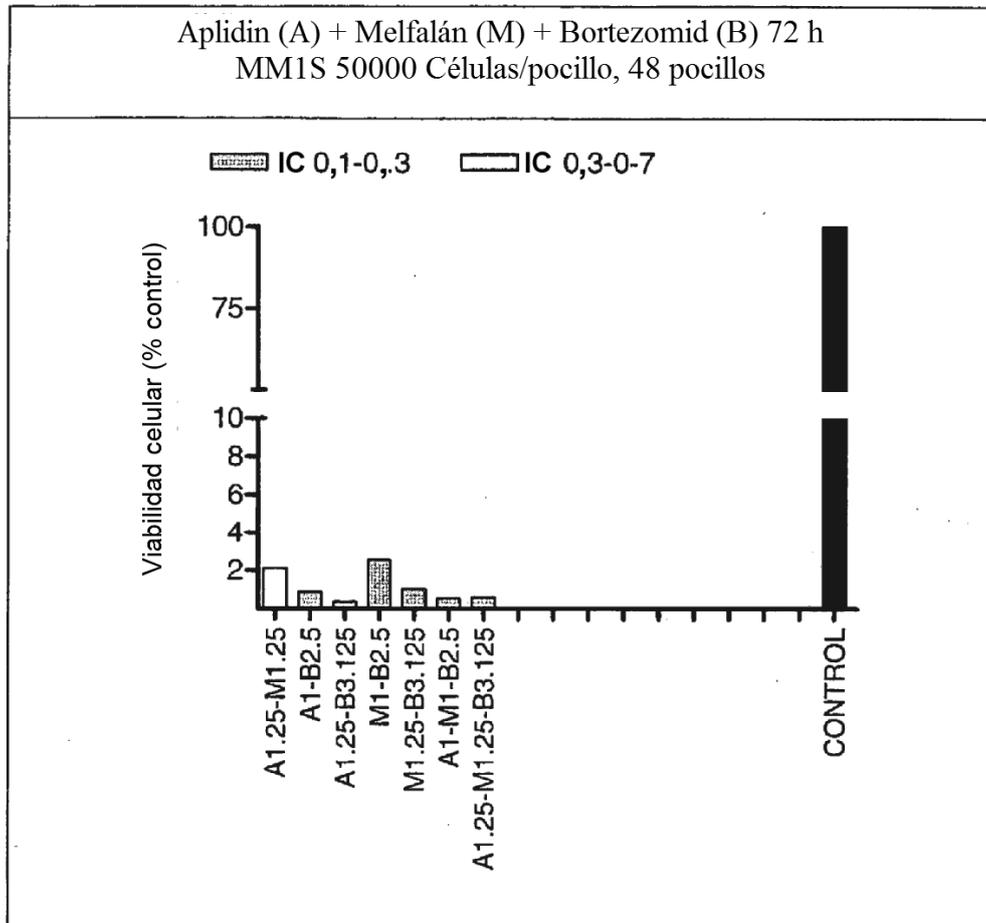


Figura 85