

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 913**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 33/36 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2014 PCT/EP2014/068772**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15032838**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2014 E 14759168 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3041477**

54 Título: **Endrogenina A y agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores quimiosensibles o quimiorresistentes**

30 Prioridad:
04.09.2013 EP 13306206

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2018

73 Titular/es:
AFFICHEM (50.0%)
9 rue Saint Joseph
31400 Toulouse, FR y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)

72 Inventor/es:
DE MEDINA, PHILIPPE;
PAILLASSE, MICHAËL;
RECHER, CHRISTIAN;
POIROT, MARC y
SILVENTE POIROT, SANDRINE

74 Agente/Representante:
VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 656 913 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

Dendrogenina A y agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores quimiosensibles o quimiorresistentes

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al tratamiento del cáncer.

10 Más concretamente, la presente invención se refiere a un kit de piezas que comprende 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente antineoplásico para su uso en el tratamiento del cáncer.

15 Además, la presente invención se refiere a 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso para el tratamiento de un cáncer quimiorresistente.

15 **Estado de la técnica**

20 El tratamiento del cáncer implica cirugía, radioterapia y quimioterapia, que se pueden usar solas o en combinación, ya sea simultánea o secuencialmente.

25 La quimioterapia emplea agentes antineoplásicos que son fármacos que previenen o inhiben la maduración y la proliferación de los neoplasmas. Los agentes antineoplásicos funcionan mediante la dirección eficaz hacia las células de rápida división. Como los agentes antineoplásicos afectan a la división celular, los tumores con fracciones de alto crecimiento (tales como la leucemia mieloide aguda y los linfomas agresivos, incluyendo la enfermedad de Hodgkin) son más sensibles a la quimioterapia, pues una mayor proporción de las células diana están experimentando división celular en cualquier momento. Los tumores malignos con tasas de crecimiento más lentas, tales como los linfomas indolentes, tienden a responder a la quimioterapia de forma mucho más modesta.

30 Sin embargo, el desarrollo de la quimiorresistencia es un problema que persiste durante el tratamiento de quimioterapia. Por ejemplo, el tratamiento convencional de la leucemia mieloide aguda (AML) comprende la administración combinada de citarabina con una antraciclina, tal como daunorrubicina. La tasa de supervivencia global a los 5 años es del 40 % en los adultos jóvenes y en torno al 10 % en los pacientes de edad avanzada. Las tasas de respuesta varían de manera espectacular con el envejecimiento, del 40 % al 55 % en pacientes mayores de 60 años y del 24 % al 33 % en pacientes mayores de 70 años. Esto es incluso peor para los ancianos con perfiles citogenéticos adversos, y la muerte en los 30 días siguientes al tratamiento varía del 10 % a 50 % a medida que avanza la edad y el empeoramiento. Además, la restricción del uso de estas moléculas también se debe a los efectos secundarios y, en particular, la aparición de toxicidad cardíaca crónica (vinculada a las antraciclinas). La tasa de mortalidad tóxica relacionada con la quimioterapia intensiva es del 10 al 20 % en pacientes mayores de 60 años.

40 Con este perfil de riesgo-beneficio de la pauta convencional, solo el 30 % de las personas de edad avanzada con LMA recién diagnosticada recibe quimioterapia antineoplásica. En las últimas décadas, solo había una modesta mejora de los resultados para los pacientes más jóvenes con LMA, pero para ninguno de los adultos mayores de 60 años (la mayoría de los pacientes con LMA). Estos datos subrayan la necesidad de una nueva combinación de enfoques tanto para reducir las pautas posológicas de los agentes antineoplásicos como para tratar los tumores quimiosensibles y evitar la resistencia de los tumores quimiorresistentes hacia el agente antineoplásico.

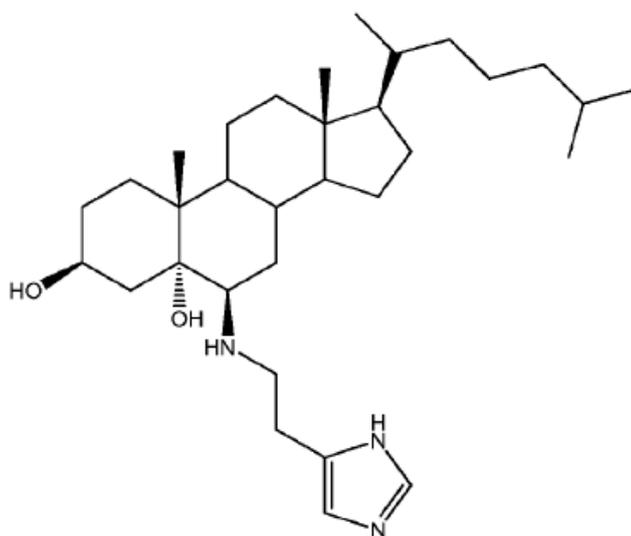
45 Se tienen que resolver dos problemas principales para alcanzar estos objetivos: 1) la quimiorresistencia; 2) la toxicidad intrínseca de los fármacos antineoplásicos.

50 Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el fenómeno de la quimiorresistencia. Las hipótesis incluyen la modificación del transporte del fármaco a través de la membrana plasmática, las respuestas genéticas, la mejora de la reparación del ADN, la alteración en moléculas diana, el acceso a las células diana, los efectos metabólicos y los factores de crecimiento. Recientemente, se han identificado pequeñas bombas en la superficie de las células cancerosas que mueven activamente los fármacos quimioterapéuticos desde el interior de la célula hacia el exterior.

55 Actualmente, hay en curso una investigación sobre la p-glicoproteína y otras de dichas bombas de evacuación de la quimioterapia. Se han explorado los medicamentos que inhiben la función de la p-glicoproteína para mejorar la eficacia de la quimioterapia. Sin embargo, este enfoque ha fallado durante la evaluación clínica. (Kolitz J. E. *et al*, *Blood* 2010; Burnett A. K. *et al.*, *Br J Hematol* 2009).

60 Existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos regímenes de tratamiento para superar la quimiorresistencia de los tumores o para aumentar la sensibilidad de los tumores a los fármacos antineoplásicos.

El compuesto farmacéuticamente activo 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol se conoce con el nombre Dendrogenina A. Su fórmula estructural I es la siguiente:



Fórmula I

5 La dendrogenina A se desvela en el documento WO03/89449 y de Medina *et al* (*J. Med. Chem.*, 2009 y *Nature Commun.* 2013), y se ha demostrado que induce la muerte celular de diversas estirpes de células tumorales. Silvente-Poirot Sandrine *et al.* (American Association for Cancer Research. Proceedings of the Annual Meeting, EE.UU., 2009, vol. 50, 1 de abril 2009, pág.1130) se refiere al tratamiento del melanoma maligno con resistencia a la dacarbazina con dendrogenina A. La dendrogenina A es el primer alcaloide esteroideo endógeno identificado en los mamíferos. Se estableció que la dendrogenina A se forma enzimáticamente en los tejidos extraídos de mamíferos, y que es un inhibidor selectivo de la epóxido hidrolasa del colesterol (de Medina *et al.*, *Nature Communications*, 2013). La dendrogenina A induce la diferenciación de las células tumorales y la infiltración de las células inmunes. Las propiedades de la dendrogenina A y su nivel reducido en los tumores sugieren una función fisiológica en el mantenimiento de la integridad y la diferenciación celulares.

15 Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que la dendrogenina A es capaz de restablecer la sensibilidad de los tumores que son quimiorresistentes a un agente antineoplásico o de aumentar los efectos de los agentes antineoplásicos hacia los tumores, lo que permite, a su vez, la reducción de la dosis citotóxica eficaz de los agentes antineoplásicos contra los tumores quimiosensibles.

20 Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un kit de piezas que comprende 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente antineoplásico para su uso en el tratamiento del cáncer.

25 En una realización, el cáncer es adenocarcinoma acinar, carcinoma acinar, melanoma acral-lentiginoso, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoescamoso, carcinoma anexial, tumor de resto suprarrenal, carcinoma adrenocortical, carcinoma secretor de aldosterona, sarcoma alveolar de piezas blandas, melanoma amelanótico, carcinoma de tiroides ameloblástico, angiosarcoma, carcinoma apocrino, tumor de Askin, astrocitoma, carcinoma de células basales, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, cáncer biliar, cáncer de hueso, cáncer de médula ósea, sarcoma botrioide, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma bronquioalveolar, adenocarcinoma broncogénico, carcinoma broncogénico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, cáncer cervical, cloroma, carcinoma colangiocelular, condrosarcoma, coriocarcinoma, carcinoma del plexo coroideo, adenocarcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, comedocarcinoma, carcinoma productor de cortisol, carcinoma de células cilíndricas, liposarcoma desdiferenciado, adenocarcinoma ductal de la próstata, carcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, cáncer duodenal, carcinoma ecrino, carcinoma embrionario, carcinoma de endometrio, carcinoma del estroma endometrial, sarcoma epiteliode, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, carcinoma exofítico, sarcoma fibroblástico, fibrocarcinoma, carcinoma fibrolamelar, fibrosarcoma, carcinoma folicular de tiroides, cáncer de vesícula biliar, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de células gigantes, sarcoma de células gigantes, tumor de hueso de células gigantes, glioma, glioblastoma multiforme, carcinoma de células granulosas, cáncer de cabeza y cuello, hemangioma, hemangiosarcoma, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células Hürthle, cáncer ileal, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma inflamatorio de la mama, carcinoma intraductal, carcinoma intraepidérmico, cáncer de yeyuno, sarcoma de Kaposi, tumor de Krukenberg, carcinoma de células Kulchitsky, sarcoma de células Kupffer, carcinoma de células grandes, cáncer de laringe, melanoma maligno de léntigo, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma maligno lobular, carcinoma lobular *in situ*, cáncer de pulmón, linfoepitelioma, linfoepitelioma, linfosarcoma, melanoma maligno, carcinoma medular, carcinoma medular de tiroides, meduloblastoma, carcinoma meníngeo, carcinoma de células de Merkel, carcinoma micropapilar, sarcoma de células

5 mixtas, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoepidermoide, melanoma de mucosa, liposarcoma mixoide, mixosarcoma, carcinoma nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, melanoma nodular, cáncer renal de células
 10 no claras, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células de avena, melanoma ocular, cáncer oral, carcinoma osteoide, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma de Paget, cáncer de páncreas, pancreatoblastoma, adenocarcinoma papilar, carcinoma papilar, carcinoma papilar de tiroides, cáncer pélvico, carcinoma periampular, tumor filoide, cáncer de hipófisis, liposarcoma pleomórfico, blastoma pleuropulmonar, carcinoma intraóseo primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma de células redondas, cáncer en cicatriz, cáncer de vejiga esquistosomal, carcinoma de Schneider, carcinoma sebáceo, carcinoma de células en anillo de sello, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, osteosarcoma microcítico,
 15 sarcoma de tejido blando, carcinoma de células fusiformes, sarcoma de células fusiformes, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, melanoma de extensión superficial, sarcoma sinovial, sarcoma telangiectático, carcinoma del conducto terminal, cáncer testicular, cáncer de tiroides, carcinoma de células de transición, carcinoma tubular, melanoma tumorigénico, carcinoma indiferenciado, adenocarcinoma uracal, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, carcinoma del cuerpo uterino, melanoma uveal, cáncer vaginal, carcinoma verrugoso, carcinoma de las vellosidades, liposarcoma bien diferenciado, tumor de Wilm o tumor de saco vitelino.

20 En una realización, el kit de piezas de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con un tumor que es quimiorresistente a dicho agente antineoplásico cuando no se administra en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho paciente.

25 En otra realización, el kit de piezas de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con un tumor que es quimiosensible a dicho agente antineoplásico, y la dosis de agente antineoplásico que se administra a dicho paciente en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es inferior a la dosis de agente antineoplásico que se administra cuando no se administra en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho paciente.

30 En una realización más particular, el cáncer es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.

35 En una realización, el agente antineoplásico es un agente que daña el ADN tal como camptotecina, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, clorambucilo, clormetina, busulfán, treosulfán o tiotepa, un antibiótico antitumoral tal como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, valrubicina, actinomicina D, mitomicina, bleomicina o plicamicina, un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo, citarabina, fludarabina o metotrexato, un antimetabólico tal como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vindesina o vinorelbina, o agentes antineoplásicos diversos, tales como bortezomib, ácido all-*trans* retinoico o trióxido de arsénico, o un producto combinado de los mismos.
 40

En una realización, el agente antineoplásico es daunorrubicina combinada con citarabina.

45 En una realización, el agente antineoplásico es fluorouracilo combinado con cisplatino.

En una realización, el agente antineoplásico es trióxido de arsénico combinado con ácido all-*trans* retinoico.

50 En una realización, el 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente antineoplásico se administran simultáneamente.

En una realización, el 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente antineoplásico se administran secuencialmente.

55 Otro objeto de la presente invención es 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso para el tratamiento de un cáncer quimiorresistente.

En una realización, dicho cáncer es quimiorresistente a la daunorrubicina, citarabina, fluorouracilo, cisplatino, ácido all-*trans* retinoico, trióxido de arsénico, bortezomib, o una combinación de los mismos.

60 Descripción de las figuras

En las figuras, se usan las siguientes abreviaturas:

65 MTT = Bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio
 Conc. = concentración
 DNR o Dauno = Daunorrubicina

Arac = Citarabina
 5-FU = 5-Fluorouracilo
 CisP = Cisplatino
 DDA = Dendrogenina A
 bort. = Bortezomib
 ATO = trióxido de arsénico
 ATRA = ácido all-*trans* retinoico

10 La Fig. 1 es un diagrama de curva que muestra el efecto de la daunorrubicina sobre la viabilidad celular de las estirpes celulares de cáncer MV4-11, KG1, KG1 a y HL60.

La Fig. 2 es un diagrama de curva que muestra el efecto de la citarabina sobre la viabilidad celular de las estirpes celulares de cáncer MV4-11, KG1, KG1 a y HL60.

15 La Fig. 3 es un diagrama de curva que muestra el efecto del 5-fluorouracilo sobre la viabilidad celular de las estirpes celulares de cáncer 5-MV4, 11, KG1a y KG1a.

20 La Fig. 4 es un diagrama de curva que muestra el efecto del cisplatino sobre la viabilidad celular de las estirpes celulares de cáncer MV4-11, KG1, KG1a y HL60.

La Fig. 5 es un diagrama de curva que muestra el efecto de la dendrogenina A sobre la viabilidad celular de las estirpes celulares de cáncer MV4-11, KG1, KG1a y HL60.

25 La Fig. 6A es un diagrama de barras que muestra la inducción de la muerte celular de Dendrogenina A y citarabina en combinación en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

La Fig. 6B es un diagrama de barras que muestra la inducción de la muerte celular de Dendrogenina A y Daunorrubicina en combinación en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

30 La Fig. 7A es un diagrama de barras que muestra la inducción de la muerte celular del fármaco de Dendrogenina A y Citarabina en combinación en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1.

La Fig. 7A es un diagrama de barras que muestra la inducción de la muerte celular del fármaco de Dendrogenina A y Daunorrubicina en combinación en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1.

35 La Fig. 8A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y daunorrubicina (relación molecular de 25:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

40 La Fig. 8B es una representación isoblográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y daunorrubicina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

45 La Fig. 8C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a para la asociación de dendrogenina A y daunorrubicina.

La Fig. 9A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y citarabina sobre la viabilidad de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

50 La Fig. 9B es una representación isoblográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina (relación molar de 5:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

55 La Fig. 9C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a para la combinación de Dendrogenina A y Citarabina.

60 La Fig.10A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina (relación molecular de 25:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

65 La Fig. 10B es una representación isoblográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

La Fig. 10C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina.

5 La Fig.11A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina (relación molecular de 25:1) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco MV4-11.

10 La Fig. 11B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco MV4-11.

15 La Fig. 11C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco MV4-11 para la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina.

La Fig. 12A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina (relación molecular de 5:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

20 La Fig. 12B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

25 La Fig. 12C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y Citarabina.

La Fig.13A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina (relación molecular de 5:1) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco MV4-11.

30 La Fig. 13B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco MV4-11.

35 La Fig. 13C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco MV4-11 para la combinación de Dendrogenina A y Citarabina.

40 La Fig.14A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y 5-fluorouracilo (relación molecular de 1:154) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.

45 La Fig. 14B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.

La Fig. 14C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer HL60 para la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo.

50 La Fig.15A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y 5-fluorouracilo (relación molecular de 1:154) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer KG1.

55 La Fig. 15B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

La Fig. 15C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo.

60 La Fig.16A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y 5-fluorouracilo (relación molecular de 1:154) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

65 La Fig. 16B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

- La Fig. 16C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1 para la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo.
- 5 La Fig. 17A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino (relación molecular de 1:1,33) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.
- La Fig. 17B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.
- 10 La Fig. 17C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60 para la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino.
- 15 La Fig. 18A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino (relación molecular de 1:1,33) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.
- La Fig. 18B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.
- 20 La Fig. 18C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino.
- 25 La Fig. 19A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino (relación molecular de 1:1,33) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.
- La Fig. 19B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.
- 30 La Fig. 19C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a para la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino.
- 35 La Fig. 20A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Bortezomib (relación molecular de 100:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.
- La Fig. 20B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Bortezomib sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.
- 40 La Fig. 20C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y Bortezomib.
- 45 La Fig. 21A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Bortezomib (relación molecular de 100:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.
- La Fig. 21B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Bortezomib sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.
- 50 La Fig. 21C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60 para la combinación de Dendrogenina A y Bortezomib.
- 55 La Fig. 22A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y trióxido de arsénico (relación molecular de 1:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.
- La Fig. 22B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y trióxido de arsénico sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.
- 60 La Fig. 22C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y trióxido de arsénico.
- 65

La Fig. 23A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y trióxido arsénico (relación molecular de 1:1) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.

5 La Fig. 23B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y trióxido de arsénico sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.

10 La Fig. 23C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60 para la combinación de Dendrogenina A y trióxido de arsénico.

15 La Fig. 24A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y ATRA (relación molecular de 1:2) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.

La Fig. 24B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y ATRA sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60.

20 La Fig. 24C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco HL60 para la combinación de Dendrogenina A y ATRA.

La Fig. 25A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y ATRA (relación molecular de 1:2) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

25 La Fig. 25B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y ATRA sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

30 La Fig. 25C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1 para la combinación de Dendrogenina A y ATRA.

La Fig. 26A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y 5-fluorouracilo (relación molecular de 1:154) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco Mcf7.

35 La Fig. 26B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco Mcf7.

40 La Fig. 26C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco Mcf7 para la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo.

45 La Fig. 27A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y 5-fluorouracilo (relación molecular de 1:154) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco SKMel28.

50 La Fig. 27B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco SKMel28.

La Fig. 27C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco SKMel28 para la combinación de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo.

55 La Fig. 28A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino (relación molecular de 1:1,33) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer resistente al fármaco Mcf7.

60 La Fig. 28B es una representación isobolográfica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Citarabina sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer resistente al fármaco Mcf7.

65 La Fig. 28C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer resistente al fármaco Mcf7 para la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino.

La Fig. 29A es un diagrama de curva que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino (relación molecular de 1:1,33) sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco SKMel28.

5 La Fig. 29B es una representación isoblográmica que muestra el efecto sinérgico de la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino sobre la viabilidad celular de la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco SKMel28.

10 La Fig. 29C es un diagrama de curva que muestra los valores del índice de combinación (IC) sobre la viabilidad celular en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco SKMel28 para la combinación de Dendrogenina A y Cisplatino.

15 La Fig. 30 es una representación gráfica de dispersión que muestra el efecto de la combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina sobre la viabilidad celular de la leucemia mieloide aguda cariotípica y fenotípicamente distinta de pacientes.

Descripción detallada de la invención

20 Un objeto de la presente invención es un kit de piezas que comprende 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol (Dendrogenina A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente antineoplásico para su uso en el tratamiento del cáncer.

25 Por "kit de piezas" se entiende un preparado combinado en el que los principios activos están separados físicamente para su uso en una terapia combinada mediante la administración simultánea o la administración secuencial al paciente.

30 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se administran Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el agente antineoplásico al paciente en una forma separada, ya sea simultánea o secuencialmente, para el tratamiento del cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a la afección fisiológica en sujetos que se caracteriza por un crecimiento celular no regulado o mal regulado o la muerte. El término "cáncer" incluye tumores sólidos y tumores de origen sanguíneo, bien malignos o benignos.

35 La presente invención se refiere al tratamiento de cánceres quimiorresistentes, así como al tratamiento de cánceres quimiosensibles.

40 Por "cáncer quimiorresistente" se entiende un cáncer en un paciente donde la proliferación de las células cancerosas no se puede prevenir o inhibir por medio de un agente antineoplásico o una combinación de agentes antineoplásicos usados, en general, para tratar dicho cáncer, a una dosis aceptable para el paciente. Los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes antes de la quimioterapia, o la resistencia puede ser adquirida durante el tratamiento por los tumores que inicialmente son sensibles a la quimioterapia.

45 Por "cáncer quimiosensible", se entiende un cáncer en un paciente que es sensible a los efectos de un agente antineoplásico, es decir, donde la proliferación de las células cancerosas se puede prevenir por medio de dicho agente antineoplásico a una dosis aceptable para el paciente.

50 Por "dosis aceptable para el paciente" se entiende una dosis que no causa la detención del tratamiento debido a efectos secundarios.

Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación:

55 adenocarcinoma acinar, carcinoma acinar, melanoma acral-lentiginoso, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoescamoso, carcinoma anexial, tumor de resto suprarrenal, carcinoma adrenocortical, carcinoma secretor de aldosterona, sarcoma alveolar de partes blandas, melanoma amelanótico, carcinoma de tiroides ameloblástico, angiosarcoma, carcinoma apocrino, tumor de Askin, astrocitoma, carcinoma de células basales, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, cáncer biliar, cáncer de hueso, cáncer de médula ósea, sarcoma botriode, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma bronquioalveolar, adenocarcinoma broncogénico, carcinoma broncogénico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, cáncer cervical, cloroma, carcinoma colangiocelular, condrosarcoma, coriocarcinoma, carcinoma del plexo coroideo, adenocarcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, comedocarcinoma, carcinoma productor de cortisol, carcinoma de células cilíndricas, liposarcoma desdiferenciado, adenocarcinoma ductal de la próstata, carcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, cáncer duodenal, carcinoma ecrino, carcinoma embrionario, carcinoma de endometrio, carcinoma del estroma endometrial, sarcoma epiteliode, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, carcinoma exofítico, sarcoma fibroblástico, fibrocarcinoma, carcinoma fibrolamelar, fibrosarcoma, carcinoma folicular de tiroides, cáncer de vesícula biliar, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de células

gigantes, sarcoma de células gigantes, tumor de hueso de células gigantes, glioma, glioblastoma multiforme, carcinoma de células granulosas, cáncer de cabeza y cuello, hemangioma, hemangiosarcoma, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células Hürthle, cáncer ileal, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma inflamatorio de la mama, carcinoma intraductal, carcinoma intraepidérmico, cáncer de yeyuno, sarcoma de Kaposi, tumor de Krukenberg, carcinoma de células Kulchitsky, sarcoma de células Kupffer, carcinoma de células grandes, cáncer de laringe, melanoma maligno de léntigo, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma maligno lobular, carcinoma lobular *in situ*, cáncer de pulmón, linfoepitelioma, linfoepitelioma, linfosarcoma, melanoma maligno, carcinoma medular, carcinoma medular de tiroides, meduloblastoma, carcinoma meníngeo, carcinoma de células de Merkel, carcinoma micropapilar, sarcoma de células mixtas, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoepidermoide, melanoma de mucosa, liposarcoma mixoide, mixosarcoma, carcinoma nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, melanoma nodular, cáncer renal de células no claras, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células de avena, melanoma ocular, cáncer oral, carcinoma osteoide, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma de Paget, cáncer de páncreas, pancreatoblastoma, adenocarcinoma papilar, carcinoma papilar, carcinoma papilar de tiroides, cáncer pélvico, carcinoma periampular, tumor filoide, cáncer de hipófisis, liposarcoma pleomórfico, blastoma pleuropulmonar, carcinoma intraóseo primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma de células redondas, cáncer en cicatriz, cáncer de vejiga esquistosomal, carcinoma de Schneider, carcinoma sebáceo, carcinoma de células en anillo de sello, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, osteosarcoma microcítico, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células fusiformes, sarcoma de células fusiformes, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, melanoma de extensión superficial, sarcoma sinovial, sarcoma telangiectático, carcinoma del conducto terminal, cáncer testicular, cáncer de tiroides, carcinoma de células de transición, carcinoma tubular, melanoma tumorigénico, carcinoma indiferenciado, adenocarcinoma uracal, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, carcinoma del cuerpo uterino, melanoma uveal, cáncer vaginal, carcinoma verrugoso, carcinoma de las vellosidades, liposarcoma bien diferenciado, tumor de Wilm o tumor de saco vitelino.

En una realización, el cáncer es melanoma, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, liposarcoma, mieloma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma agresivo o metastásico, así como cáncer de cabeza y cuello.

La presente invención se refiere más en particular al cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente antineoplásico" se refiere a un fármaco o una combinación de fármacos que previene o inhibe la maduración y la proliferación de los tumores.

Los agentes antineoplásicos se clasifican de acuerdo con su modo de acción. Las diversas clases de agentes antineoplásicos incluyen, en particular, agentes que dañan el ADN, antibióticos antitumorales, antimetabolitos, antimitóticos y agentes antineoplásicos diversos.

Los agentes que dañan el ADN incluyen agentes alquilantes y los inhibidores de la topoisomerasa.

Los inhibidores de topoisomerasa (código L01CB y L01XX de la Anatomical Therapeutic Chemical Classification (ATC)) son agentes que bloquean las topoisomerasas de tipo I o de tipo II interfiriendo así con tanto la transcripción y la replicación del ADN por desajustar el superenrollamiento del ADN apropiado. Los ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa de tipo I incluyen camptotecinas, irinotecán y topotecán. Los ejemplos de inhibidores de tipo II incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido.

Los agentes alquilantes (código ATC L01A) se denominan así debido a su capacidad para alquilar muchos grupos funcionales nucleófilos en condiciones presentes en las células. Estos alteran la función celular mediante la formación de enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato en las moléculas biológicamente importantes. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen ciclofosfamida, clorambucilo, clormetina, busulfán, treosulfán, tiotepa y compuestos de platino, tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino.

Los antibióticos antitumorales incluyen principalmente antraciclinas (código ATC: L01DB) tales como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona o valrubicina, y otros antibióticos antitumorales (código ATC: L01DC) tales como la actinomicina D, mitomicina, bleomicina o plicamicina.

Los antimetabolitos (código ATC L01B) son similares en estructura a compuestos de origen natural que se requieren para la viabilidad y la división de una célula. La eficacia de los antimetabolitos más importantes contra una selección de células tumorales se basa en la inhibición de vía de síntesis de nucleósidos de purina o pirimidina que se requieren para la síntesis del ADN.

5 Los antimetabolitos se pueden dividir en varias clases, incluyendo los antagonistas de folato tales como metotrexato, antagonistas de purina tales como fludarabina y antagonistas de pirimidina tales como fluorouracilo y citarabina.

Los antimitóticos incluyen taxanos y alcaloides de la vinca.

10 Los taxanos (código ATC: L01CD) interfieren con los microtúbulos. Bloquean el crecimiento celular deteniendo la mitosis. Los ejemplos de taxanos incluyen paclitaxel y docetaxel.

15 Los alcaloides de la vinca (código ATC: L01CA) se unen a sitios específicos sobre la tubulina, inhibiendo el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos (fase M del ciclo celular). Se derivan de la vinca de Madagascar, *Catharanthus roseus* (anteriormente conocida como *Vinca rosea*).

Los ejemplos de alcaloides de la vinca son vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina.

20 Los diversos agentes antineoplásicos incluyen, por ejemplo, Bortezomib, ácido all-*trans* retinoico y trióxido de arsénico.

25 En una realización, el agente antineoplásico es un agente que daña el ADN tal como camptotecina, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, clorambucilo, clormetina, busulfán, treosulfán o tiotepa, un antibiótico antitumoral tal como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, valrubicina, actinomicina D, mitomicina, bleomicina o plicamicina, un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo, citarabina, fludarabina o metotrexato, un antimitótico tal como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vindesina o vinorelbina, o agentes antineoplásicos diversos, tales como Bortezomib, ácido all-*trans* retinoico o trióxido de arsénico, o un producto combinado de los mismos.

30 En una realización, el agente antineoplásico es un producto combinado de al menos dos principios activos. Los dos principios activos se pueden administrar por separado al paciente o administrarse en el mismo preparado.

35 En una realización, el agente antineoplásico es daunorrubicina combinada con citarabina.

En una realización, el agente antineoplásico es fluorouracilo combinado con cisplatino.

40 En una realización, el agente antineoplásico es trióxido de arsénico combinado con ácido all-*trans* retinoico.

45 Las sales farmacéuticamente aceptables de Dendrogenina A incluyen (pero sin limitación) sales de adición de ácido formadas con un ácido, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en un ácido inorgánico, un ácido carboxílico o sulfónico alifático acíclico que comprende no más de 8 átomos de carbono, y un ácido carboxílico o sulfónico aromático que comprende ningún grupo de más de 4 arilos.

50 Los ácidos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido L-láctico (ácido 2(S)-hidroxipropanoico), ácido tartárico, ácido L-málico, ácido succínico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido glutárico, ácido L-tartárico, ácido D-tartárico, ácido 2(S)-hidroxipropanoico, ácido cítrico, ácido malónico y ácido tartárico (D o L), ácido mesílico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-metilbencenosulfónico y ácido pamoico (ácido 4,4'-metilénbis(3-hidroxi-2-naftoico)).

55 La presente invención es útil para el tratamiento de tumores quimiorresistentes, es decir, tumores para los que no es eficaz un tratamiento con un agente antineoplásico. Los tumores pueden ser intrínsecamente quimiorresistentes o desarrollar resistencia a la quimioterapia durante el tratamiento.

60 Por lo tanto, en una realización, se usa Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la terapia combinada con un agente antineoplásico para restablecer la sensibilidad de un tumor que es resistente a este agente antineoplásico, en particular, para restablecer la inducción de la muerte celular de este agente antineoplásico.

65 Así pues, en una realización, el kit de piezas de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con un tumor que es quimiorresistente a dicho agente antineoplásico cuando no se administra en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestano-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho paciente.

- 5 En otra realización, se usa Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la terapia combinada con un agente antineoplásico para reducir la dosis eficaz de este agente antineoplásico. En esta realización, la Dendrogenina A es capaz de potenciar el efecto terapéutico del agente antineoplásico y, por lo tanto, se puede usar para limitar la toxicidad intrínseca de un agente antineoplásico a través de la reducción de la dosis eficaz, permitiendo de este modo, por ejemplo, el tratamiento de un paciente anciano que no sea inicialmente elegible para el tratamiento con dicho agente antineoplásico.
- 10 Así pues, en otra realización, el kit de piezas de la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con un tumor que es quimiosensible a dicho agente antineoplásico, y la dosis de agente antineoplásico que se administra a dicho paciente en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es inferior a la dosis de agente antineoplásico cuando no se administra en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho paciente.
- 15 De acuerdo con la presente invención, la Dendrogenina A puede administrarse como una formulación farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualquiera de los modos aceptados de administración, preferentemente por vía intravenosa u oral.
- 20 Los intervalos de dosis adecuados normalmente son de 0,1 a 50.000 μ g/kg de peso corporal al día, preferentemente de 1.000 a 40.000 μ g/kg de peso corporal al día, y lo más preferentemente de 40.000 μ g/kg de peso corporal al día, dependiendo de numerosos factores tales como la gravedad del cáncer que va a tratarse, la edad y salud relativa del sujeto, la vía y la forma de administración.
- 25 El agente antineoplásico se puede administrar como una formulación farmacéutica de una manera convencional, dependiendo del tipo de cáncer que se vaya a tratar y de su gravedad, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del agente antineoplásico usado, la vía y la forma de administración, la indicación hacia la que se dirige la administración, y las preferencias y experiencia del médico implicado. Un experto en la materia del tratamiento de dichas enfermedades será capaz, basándose en sus conocimientos personales, de evaluar la cantidad terapéuticamente eficaz del agente antineoplásico de la presente invención para un cáncer dado.
- 30 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y las formas de dosificación unitaria pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo proporcional al intervalo de dosis diario que se pretende emplear.
- 35 En una realización, la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el agente antineoplásico se administran simultáneamente.
- 40 En otra realización, la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y el agente antineoplásico se administran secuencialmente.
- En una realización particular y preferida, la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra antes del agente antineoplásico.
- 45 En una determinada realización, la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra después del agente antineoplásico.
- 50 Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento del cáncer en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]coleston-3 β -ol (Dendrogenina A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico, como se ha descrito anteriormente.
- 55 Otro objeto de la presente invención es la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento del cáncer quimiorresistente, en el que la Dendrogenina A se usa como el único principio activo, es decir, no en combinación con ningún otro agente antineoplásico.
- 60 En una realización, dicho cáncer quimiorresistente a la daunorrubicina, citarabina, fluorouracilo, cisplatino, ácido all-*trans* retinoico, trióxido arsénico, bortezomib, o una combinación de los mismos.
- 65 En una realización, dicho cáncer quimiorresistente es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.
- En una realización, dicho cáncer no es melanoma metastásico resistente a la dacarbazina.

En una realización, dicho cáncer no es melanoma metastásico B16F10.

El melanoma metastásico B16F10 es un melanoma murino que no porta ninguna mutación en el gen *Braf*, en los genes *ras* y en el gen *p53*.

5 En una realización, dicho cáncer es un melanoma metastásico resistente a la dacarbazina y dicho cáncer porta una mutación en el gen *ras*.

10 En una realización, dicho cáncer es un melanoma metastásico resistente a la dacarbazina y dicho cáncer porta una mutación en el gen *BRaf*.

En una realización, dicho cáncer es un melanoma metastásico resistente a la dacarbazina y dicho cáncer porta una mutación en el gen *p53*.

15 En una realización, dicho cáncer es un melanoma metastásico resistente a la dacarbazina y dicho cáncer porta una mutación en los genes *ras*, en el gen *BRaf* y en el gen *p53*.

20 Otro objeto de la presente invención es la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento del cáncer quimiorresistente humano, en el que la Dendrogenina A se usa como el único principio activo, es decir, no en combinación con ningún otro agente antineoplásico.

En una realización, dicho cáncer humano es quimiorresistente a la daunorrubicina, citarabina, fluorouracilo, cisplatino, ácido all-*trans* retinoico, trióxido de arsénico, bortezomib, o una combinación de los mismos.

25 En una realización, dicho cáncer quimiorresistente humano es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.

30 Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento de un cáncer quimiorresistente en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestano-3 β -ol (Dendrogenina A) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Otro objeto de la presente invención es la Dendrogenina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente tratado con un agente antineoplásico, en el que dicho cáncer es quimiorresistente a dicho agente antineoplásico.

En una realización, dicho cáncer es quimiorresistente a la daunorrubicina, citarabina, fluorouracilo, cisplatino, ácido all-*trans* retinoico, trióxido de arsénico, bortezomib, o una combinación de los mismos.

40 En una realización, dicho cáncer quimiorresistente es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.

45 La presente invención se dirige, en particular, al tratamiento de un paciente que tiene cáncer y que está desarrollando una resistencia a un agente antineoplásico. En ese caso, se puede administrar Dendrogenina A en sustitución del agente antineoplásico al que el cáncer es resistente o en combinación para este agente antineoplásico.

50 La presente invención también se dirige a la mejora del tratamiento de un paciente que tiene cáncer que está sometido a quimioterapia con un agente antineoplásico. En ese caso, se puede administrar Dendrogenina A en combinación con el agente antineoplásico con el fin de reducir la dosis de agente antineoplásico administrado al paciente y, por lo tanto, de mejorar el tratamiento.

55 La invención se describirá ahora además en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención y, bajo ningún concepto, se deben ver como limitantes de la invención.

60 Se diseñaron experimentos para adaptarlos a los métodos previamente descritos por Chou y Talalay para cuantificar la sinergia de las combinaciones de fármacos (*Chou Cancer Res* 2010, y Chou y Talalay, *Eur J biochem* 1985). En resumen, se determinó el efecto de los fármacos solos y en combinaciones para una escala logarítmica en base 3-5 de concentraciones de fármacos y con una proporción constante entre los dos fármacos usados para el tratamiento conjunto. Se sembraron células en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra, durante 48 horas. Se determinó la viabilidad celular con el ensayo de MTT. Las células se centrifugaron 5 minutos a 1.200 rpm, se retiró el medio, se añadieron 100 μ l de solución de MTT (1 mg/ml en PBS), se incubaron durante 2 horas a 37 °C, se centrifugaron, se retiró la solución de MTT y se añadió DMSO (100 μ l) para disolver el formazán púrpura formado por las células vivas. Se determinó la absorbancia de la solución a 540 nm. Este procedimiento general se usó en los Ejemplos 1 a 5 y 8 a 25.

Ejemplo 1

Efecto de la Daunorrubicina en la viabilidad celular de estirpes celulares de cáncer fenotípica y genotípicamente diferentes

5 Se sembraron células HL60, KG1, KG1a y MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de daunorrubicina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT de la siguiente manera: se centrifugaron las células 5 minutos a 1.200 rpm, se retiró el medio, se añadieron 100 µl de solución de MTT (1 mg/ml en PBS), se incubaron durante 2 horas a 37 °C, se
10 centrifugaron, se retiró la solución de MTT y se añadió DMSO (100 µl) para disolver el formazán púrpura formado por las células vivas. Se determinó la absorbancia de la solución a 540 nm.

El porcentaje de células viables en función de la concentración de Daunorrubicina se representa en la Figura 1.

15 La Figura 1 muestra que las células KG1a tienden a ser resistentes a la Daunorrubicina en comparación con las células KG1. Las células HL60 y MV4-11 tienden a ser tan sensibles como las células KG1 a la Daunorrubicina.

Ejemplo 2

20 Efecto de la Citarabina en la viabilidad celular de estirpes celulares de cáncer fenotípica y genotípicamente diferentes

Se sembraron células HL60, KG1, KG1a y MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de citarabina, durante 48 horas. La viabilidad celular se
25 determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

El porcentaje de células viables en función de la concentración de Citarabina se representa en la Figura 2.

30 La Figura 2 muestra que las células KG1a tienden a ser resistentes a la Citarabina en comparación con las células KG1, pero en menor grado que la Daunorrubicina. Las células HL60 y MV4-11 tienden a ser más sensibles que las células KG1 a la Citarabina.

Ejemplo 3

35 Efecto de 5-Fluorouracilo en la viabilidad celular de estirpes celulares de cáncer fenotípica y genotípicamente diferentes

Se sembraron células HL60, KG1, KG1a y MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de 5-fluorouracilo, durante 48 horas. La viabilidad celular
40 se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

El porcentaje de células viables en función de la concentración de 5-Fluorouracilo se representa en la Figura 3.

45 La Figura 3 muestra que las células KG1a tienden a ser resistentes al 5-Fluorouracilo en comparación con las células KG1, en el mismo grado que la Citarabina, pero en menor grado que la Daunorrubicina. Las células HL60 y MV4-11 tienden a ser más resistentes a 5-FU en comparación con la Daunorrubicina o la Citarabina.

Ejemplo 4

50 Efecto del Cisplatino en la viabilidad celular de estirpes celulares de cáncer fenotípica y genotípicamente diferentes

Se sembraron células HL60, KG1, KG1a y MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de cisplatino, durante 48 horas. La viabilidad celular se
55 determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

El porcentaje de células viables en función de la concentración de Cisplatino se representa en la Figura 4.

60 La Figura 4 muestra que las células KG1a tienden a ser resistentes al Cisplatino en comparación con las células KG1, pero en menor grado que la Daunorrubicina o la Citarabina. Las células HL60 son tan sensibles al Cisplatino como a la Daunorrubicina y a la Citarabina, pero las células MV4-11 tienden a ser más resistentes al Cisplatino en comparación con la Daunorrubicina o la Citarabina.

Ejemplo 5

65 Efecto de la Dendrogenina A en la viabilidad celular de estirpes celulares de cáncer fenotípica y genotípicamente diferentes

Se sembraron células HL60, KG1, KG1a y MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

5 El porcentaje de células viables en función de la concentración de Dendrogenina A se representa en la Figura 5.

La Figura 5 muestra que las células KG1a tienden a ser tan sensibles como las células KG1 a la Daunorrubicina A, mientras que las células KG1a tienden a ser resistentes a la Daunorrubicina, Citarabina, 5-Fluorouracilo y Cisplatino. Además, las células MV4-11 y HL60 tienden a ser tan sensibles como las células KG1 y KG1a a la Dendrogenina A. Estos resultados son indicativo de la capacidad de la Dendrogenina A para tratar los cánceres quimiorresistentes.

La Tabla 1 proporciona los valores de CI_{50} determinados usando los ensayos de viabilidad celular como se describe en los Ejemplos 1 a 5 de los diferentes agentes antineoplásicos ensayados en estos ejemplos.

15 Tabla 1

		CI_{50} (μM)				
		Dendrogenina A	Citarabina	Daunorrubicina	5-Fluorouracilo	Cisplatino
Estirpe celular	MV4-11	7,27	0,18	0,067	2156	7,20
	KG1	8,86	0,34	0,064	756	3,29
	KG1a	13,2	1,53	1,08	3992	9,59
	HL60	8,06	0,16	0,062	2448	3,29

Los datos de la Tabla 1 muestran que la Dendrogenina A es el fármaco que presenta la menor diferencia de CI_{50} entre las estirpes celulares quimiosensibles y quimiorresistentes. La proporción de CI_{50} de KG1a/KG1 es de 1,5 en comparación con 2,9 para el cisplatino, 4,5 para la citarabina, 5,3 para el 5-fluorouracilo y 17 para daunorrubicina. Esto subraya que la Dendrogenina A es capaz de tratar tumores de manera eficiente, independientemente de su estado de resistencia a otros agentes antineoplásicos. Por lo tanto, la Dendrogenina A puede ser un buen candidato para el tratamiento de tumores que son resistentes a otros agentes antineoplásicos.

25 Ejemplo 6

La Dendrogenina A restablece la inducción de muerte celular por la daunorrubicina y la citarabina en la estirpe celular de cáncer quimiorresistente KG1a.

En una placa de 6 micropocillos, se sembraron $0,5 \times 10^6$ células de la estirpe celular KG1a. El mismo día, se añadieron vehículo Solvant o concentraciones diferentes de Dendrogenina A (concentraciones finales: 5 y 10 μM) sola o en combinación con Daunorrubicina (concentración final: 0,5 μM) o citarabina (concentración final: 1 μM) al pocillo. Tras 48 horas de incubación, se centrifugaron las suspensiones de células y se volvieron a suspender los sedimentos celulares en la solución de azul de tripano (0,25 % (p/v) en PBS) y se contaron en una celda de Malassez bajo un microscopio óptico. Los resultados se muestran en las Figuras VIa y VIb (Daunorrubicina y Citarabina respectivamente).

La Figura 6A muestra que las células KG1a tienden a ser resistentes a la Daunorrubicina, y que la Dendrogenina A es capaz de abolir esta resistencia.

40 La Figura 6B muestra que las células KG1a tienden a ser resistentes a la Citarabina, y que la Dendrogenina A es capaz de abolir esta resistencia.

Ejemplo 7

45 La Dendrogenina A aumenta la actividad citotóxica de la Daunorrubicina y la Citarabina en la estirpe celular de cáncer sensible al fármaco KG1.

En una placa de 6 micropocillos, se sembraron $0,5 \times 10^6$ células de la estirpe celular KG1. El mismo día, se añadieron vehículo Solvant o Dendrogenina A (concentraciones finales: 2,5 μM) al pocillo durante 24 horas. A continuación, se añadieron Daunorrubicina (concentración final: 0,05, 0,1, 0,25 y 0,5 μM) o citarabina (concentración final: 0,1, 0,2, 0,5 y 1 μM) a células KG1a. Tras cultivar las células durante 48 horas más, se centrifugaron las suspensiones de cultivo y se volvieron a suspender los sedimentos celulares en la solución de azul de tripano (0,25 % (p/v) en PBS) y se contaron en una celda de Malassez bajo un microscopio óptico. Los resultados se muestran en la Fig. 7A y 7B (Daunorrubicina y Citarabina respectivamente).

55

La Figura 7A muestra que las células KG1 tienden a ser sensibles a la Daunorrubicina en comparación con las células KG1a, y que la Dendrogenina A es capaz de aumentar esta sensibilidad.

5 La Figura 7B muestra que las células KG1 tienden a ser sensibles a la Citarabina en comparación con las células KG1a, y que la Dendrogenina A es capaz de aumentar esta sensibilidad.

Ejemplo 8

10 La actividad sinérgica de la asociación de Dendrogenina A/Daunorrubicina en la estirpe celular quimiorresistente KG1a

15 Se sembraron células KG1a en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Daunorrubicina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y la Daunorrubicina reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular quimiorresistente KG1a, como se muestra en las figuras 8a, 8b y 8c.

20 Ejemplo 9

La actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Citarabina en la estirpe celular quimiorresistente KG1a

25 Se sembraron células KG1a en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Citarabina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y la Citarabina reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular quimiorresistente KG1a, como se muestra en las figuras 9a, 9b y 9c.

30 Ejemplo 10

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Daunorrubicina en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

35 Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Daunorrubicina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

40 La asociación de la Dendrogenina A y la Daunorrubicina reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en las figuras 10a, 10b y 10c.

Ejemplo 11

45 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Daunorrubicina en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica MV4-11

50 Se sembraron células MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Daunorrubicina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y la Daunorrubicina reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco MV4-11, como se muestra en las figuras 11A, 11B y 11C.

55 Ejemplo 12

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Citarabina en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

60 Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Citarabina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y la Citarabina reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en la figura 12.

65

Ejemplo 13

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Citarabina en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica MV4-11.

5 Se sembraron células MV4-11 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Citarabina, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 La asociación de la Dendrogenina A y la Citarabina reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco MV4-11, como se muestra en las figuras 13a, 13b y 13c.

Ejemplo 14

15 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/5-Fluorouracilo en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica HL60

20 Se sembraron células HL60 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y el 5-Fluorouracilo reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco HL60, como se muestra en las figuras 14a, 14b y 14c.

25 Ejemplo 15

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/5-Fluorouracilo en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

30 Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

35 La asociación de la Dendrogenina A y el 5-Fluorouracilo reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en las figuras 15a, 15b y 15c.

Ejemplo 16

40 La actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/5-Fluorouracilo en la estirpe celular quimiorresistente KG1a

45 Se sembraron células KG1a en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y el 5-Fluorouracilo reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular quimiorresistente KG1a, como se muestra en las figuras 16a, 16b y 16c.

Ejemplo 17

50 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Cisplatino en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica HL60

55 Se sembraron células HL60 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Cisplatino, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y el cisplatino reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco HL60, como se muestra en las figuras 17a, 17b y 17c.

60 Ejemplo 18

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Cisplatino en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

65

Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Cisplatino, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

- 5 La asociación de la Dendrogenina A y el cisplatino reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en las figuras 18a, 18b y 18c.

Ejemplo 19

- 10 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Cisplatino en la estirpe celular quimiorresistente KG1a

Se sembraron células KG1a en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Cisplatino, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

- 15 La asociación de la Dendrogenina A y el cisplatino reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular quimiorresistente KG1a, como se muestra en las figuras 19a, 19b y 19c.

Ejemplo 20

- 20 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Bortezomib en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

- 25 Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Bortezomib, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

- 30 La asociación de la Dendrogenina A y el Bortezomib reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en las figuras 20a, 20b y 20c.

Ejemplo 21

- 35 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/Bortezomib en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica HL60

Se sembraron células HL60 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y Bortezomib, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

- 40 La asociación de la Dendrogenina A y el Bortezomib reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco HL60, como se muestra en la figura 21.

Ejemplo 22

- 45 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/trióxido de arsénico en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

- 50 Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y trióxido de arsénico, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

- 55 La asociación de la Dendrogenina A y el trióxido de arsénico reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en las figuras 22a, 22b y 22c. Solo existe sinergia cuando se ve afectada la mayoría de las células cancerosas, por lo que será necesario que un buen conocimiento de la sensibilidad del tumor al trióxido de arsénico y a la Dendrogenina A esté en el intervalo sinérgico óptimo.

Ejemplo 23

- 60 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/trióxido de arsénico en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica HL60

- 65 Se sembraron células HL60 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y trióxido de arsénico, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y el trióxido de arsénico reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco HL60, como se muestra en las figuras 23a, 23b y 23c. Solo existe sinergia cuando se ve afectada la mayoría de las células cancerosas, por lo que será necesario que un buen conocimiento de la sensibilidad del tumor al trióxido de arsénico y a la Dendrogenina A esté en el intervalo sinérgico óptimo.

5 Ejemplo 24

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/ácido all-*trans* retinoico en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica KG1

10 Se sembraron células KG1 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y ácido all-*trans* retinoico, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

15 La asociación de la Dendrogenina A y el ácido all-*trans* retinoico reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco KG1, como se muestra en las figuras 24a, 24b y 24c.

Ejemplo 25

20 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/ácido all-*trans* retinoico en la estirpe celular sensible al fármaco citotóxica HL60

25 Se sembraron células HL60 en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y ácido all-*trans* retinoico, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y el ácido all-*trans* retinoico reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco HL60, como se muestra en las figuras 25a, 25b y 25c.

30 Ejemplo 26

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/5-Fluorouracilo en la estirpe celular sensible al fármaco MCF-7

35 Se sembraron células MCF-7 en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

40 La asociación de la Dendrogenina A y el 5-Fluorouracilo reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco MCF-7, como se muestra en las figuras 26a, 26b y 26c. Solo existe sinergia cuando se ve afectada la mayoría de las células cancerosas, por lo que será necesario que un buen conocimiento de la sensibilidad del tumor al 5-Fluorouracilo y a la Dendrogenina A esté en el intervalo sinérgico óptimo.

45 Ejemplo 27

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/5-Fluorouracilo en la estirpe celular sensible al fármaco SK-MEL-28

50 Se sembraron células SK-MEL-28 en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y 5-Fluorouracilo, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

La asociación de la Dendrogenina A y el 5-Fluorouracilo reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular sensible al fármaco SK-MEL-28, como se muestra en las figuras 27a, 27b y 27c.

55 Ejemplo 28

Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/CisPlatino en la estirpe celular resistente al fármaco MCF-7

60 Se sembraron células MCF-7 en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y CisPlatino, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

65 La asociación de la Dendrogenina A y el CisPlatino reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular resistente al fármaco MCF-7, como se muestra en las figuras 28a, 28b y 28c. Solo existe sinergia cuando se ve

afectada la mayoría de las células cancerosas, por lo que será necesario que un buen conocimiento de la sensibilidad del tumor al CisPlatino y a la Dendrogenina A esté en el intervalo sinérgico óptimo.

Ejemplo 29

5 Actividad sinérgica de la asociación de la Dendrogenina A/CisPlatino en la estirpe celular resistente al fármaco SK-MEL-28

10 Se sembraron células SK-MEL-28 en placas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo). Las células se trataron justo después de la siembra con dosis crecientes de Dendrogenina A y CisPlatino, durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT como se ha descrito en el Ejemplo 1.

15 La asociación de la Dendrogenina A y el CisPlatino reduce sinérgicamente la viabilidad de la estirpe celular resistente al fármaco SK-MEL-28, como se muestra en las figuras 29a, 29b y 29c. Solo existe sinergia cuando se ve afectada la mayoría de las células cancerosas, por lo que será necesario que un buen conocimiento de la sensibilidad del tumor al CisPlatino y a la Dendrogenina A esté en el intervalo sinérgico óptimo.

Ejemplo 30

20 La Dendrogenina A aumenta la sensibilidad citotóxica hacia la Daunorrubicina de muestras de pacientes de LMA cariotípica y fenotípicamente diferentes

25 En una placa de 6 micropocillos, se sembraron $0,5 \times 10^6$ células del paciente. El mismo día, se añadieron vehículo Solvant o concentraciones diferentes de Dendrogenina A (concentraciones finales: $5 \mu\text{M}$) sola o en combinación con Daunorrubicina (concentración final: $10 \mu\text{M}$) al pocillo. Tras 48 horas de incubación, se centrifugaron las suspensiones de células y se lavaron con PBS, y se volvieron a suspender los sedimentos celulares en una solución de marcaje que contenía Anexina V-FitC y 7-AAD según lo descrito en el protocolo del kit (kit de tinción de Anexina V-FitC/7-AAD, Roche Applied Science). A continuación, se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente a oscuras y se analizaron mediante citometría de flujo Facs. Los resultados se muestran en la Fig. 30.

30 El presente ejemplo muestra que, por un lado, la Dendrogenina A es capaz de inducir una tasa de muerte celular alta o moderada de las células tumorales resistentes a la Daunorrubicina y, por otro lado, que una combinación de Dendrogenina A y Daunorrubicina es capaz de inducir la tasa de muerte celular total de las mismas células tumorales.

35

REIVINDICACIONES

1. Kit de piezas que comprende 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente antineoplásico para su uso en el tratamiento del cáncer.
2. Kit de piezas para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es adenocarcinoma acinar, carcinoma acinar, melanoma acral-lentiginoso, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoescamoso, carcinoma anexial, tumor de resto suprarrenal, carcinoma adrenocortical, carcinoma secretor de aldosterona, sarcoma alveolar de partes blandas, melanoma amelanótico, carcinoma de tiroides ameloblástico, angiosarcoma, carcinoma apocrino, tumor de Askin, astrocitoma, carcinoma de células basales, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, cáncer biliar, cáncer de hueso, cáncer de médula ósea, sarcoma botriode, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma bronquioalveolar, adenocarcinoma broncogénico, carcinoma broncogénico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, cáncer cervical, cloroma, carcinoma colangiocelular, condrosarcoma, coriocarcinoma, carcinoma del plexo coroideo, adenocarcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, comedocarcinoma, carcinoma productor de cortisol, carcinoma de células cilíndricas, liposarcoma desdiferenciado, adenocarcinoma ductal de la próstata, carcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, cáncer duodenal, carcinoma ecrino, carcinoma embrionario, carcinoma de endometrio, carcinoma del estroma endometrial, sarcoma epiteliode, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, carcinoma exofítico, sarcoma fibroblástico, fibrocarcinoma, carcinoma fibrolamelar, fibrosarcoma, carcinoma folicular de tiroides, cáncer de vesícula biliar, adenocarcinoma gástrico, carcinoma de células gigantes, sarcoma de células gigantes, tumor de hueso de células gigantes, glioma, glioblastoma multiforme, carcinoma de células granulosas, cáncer de cabeza y cuello, hemangioma, hemangiosarcoma, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células Hürthle, cáncer ileal, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma inflamatorio de la mama, carcinoma intraductal, carcinoma intraepidérmico, cáncer de yeyuno, sarcoma de Kaposi, tumor de Krukenberg, carcinoma de células Kulchitsky, sarcoma de células Kupffer, carcinoma de células grandes, cáncer de laringe, melanoma maligno de léntigo, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma lobular, carcinoma lobular *in situ*, cáncer de pulmón, linfoepitelioma, linfoepitelioma, linfosarcoma, melanoma maligno, carcinoma medular, carcinoma medular de tiroides, meduloblastoma, carcinoma meníngeo, carcinoma de células de Merkel, carcinoma micropapilar, sarcoma de células mixtas, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoepidermoide, melanoma de mucosa, liposarcoma mixoide, mixosarcoma, carcinoma nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, melanoma nodular, cáncer renal de células no claras, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células de avena, melanoma ocular, cáncer oral, carcinoma osteoide, osteosarcoma, cáncer de ovario, carcinoma de Paget, cáncer de páncreas, pancreatoblastoma, adenocarcinoma papilar, carcinoma papilar, carcinoma papilar de tiroides, cáncer pélvico, carcinoma periampular, tumor filoide, cáncer de hipófisis, liposarcoma pleomórfico, blastoma pleuropulmonar, carcinoma intraóseo primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma de células redondas, cáncer en cicatriz, cáncer de vejiga esquistosomal, carcinoma de Schneider, carcinoma sebáceo, carcinoma de células en anillo de sello, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, osteosarcoma microcítico, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células fusiformes, sarcoma de células fusiformes, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, melanoma de extensión superficial, sarcoma sinovial, sarcoma telangiectático, carcinoma del conducto terminal, cáncer testicular, cáncer de tiroides, carcinoma de células de transición, carcinoma tubular, melanoma tumorigénico, carcinoma indiferenciado, adenocarcinoma uracal, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, carcinoma del cuerpo uterino, melanoma uveal, cáncer vaginal, carcinoma verrugoso, carcinoma de las vellosidades, liposarcoma bien diferenciado, tumor de Wilm o tumor de saco vitelino.
3. Kit de piezas para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.
4. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con un tumor que es quimiorresistente a dicho agente antineoplásico cuando no se administra en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho paciente.
5. Kit de piezas para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente con un tumor que es quimiosensible a dicho agente antineoplásico, en el que la dosis de agente antineoplásico que se administra a dicho paciente en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es inferior a la dosis de agente antineoplásico cuando no se administra en combinación con 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho paciente.
6. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente antineoplásico es un agente que daña el ADN tal como camptotecina, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, clorambucilo, clormetina, busulfán, treosulfán o tiotepa, un antibiótico antitumoral tal como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, valrubicina, actinomicina D, mitomicina, bleomicina o plicamicina, un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo, citarabina, fludarabina o metotrexato, un antimetabólico tal como paclitaxel, docetaxel, vinblastina,

vincristina, vindesina o vinorelbina, o agentes antineoplásicos diversos, tales como Bortezomib, ácido *all-trans* retinoico o trióxido arsénico, o un producto combinado de los mismos.

- 5 7. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente antineoplásico es daunorrubicina combinada con citarabina.
8. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente antineoplásico es fluorouracilo combinado con cisplatino.
- 10 9. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente antineoplásico es trióxido de arsénico combinado con ácido *all-trans* retinoico.
- 15 10. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la administración simultánea de 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente antineoplásico.
- 20 11. Kit de piezas para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la administración secuencial de 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente antineoplásico.
- 25 12. Kit de piezas para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra antes del agente antineoplásico.
- 30 13. 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un cáncer quimiorresistente, en el que el cáncer quimiorresistente es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.
- 35 14. 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho cáncer es quimiorresistente a la daunorrubicina, citarabina, fluorouracilo, cisplatino, ácido *all-trans* retinoico, trióxido de arsénico, Bortezomib, o una combinación de los mismos.
- 40 15. 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente tratado con un agente antineoplásico, en el que dicho cáncer es quimiorresistente a dicho agente antineoplásico, en el que dicho agente antineoplásico es daunorrubicina, citarabina, fluorouracilo, cisplatino, ácido *all-trans* retinoico, trióxido de arsénico, Bortezomib, o una combinación de los mismos.
- 45 16. 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el cáncer quimiorresistente es un cáncer hematológico o cáncer sanguíneo tal como la leucemia, en particular, leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda, linfoma, en particular, linfoma de no Hodgkin o mieloma múltiple.
- 50 17. 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en el que el 5 α -hidroxi-6 β -[2-(1*H*-imidazol-4-il)etilamino]colestan-3 β -ol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en sustitución de dicho agente antineoplásico al que el cáncer es resistente o en combinación con este agente antineoplásico.

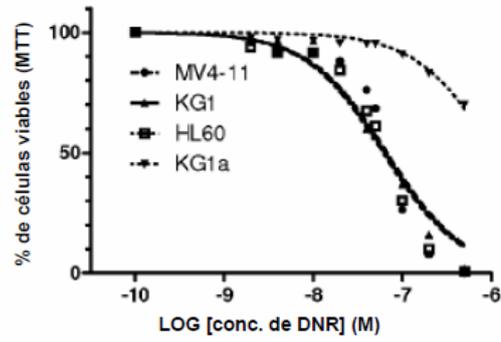


Fig. 1

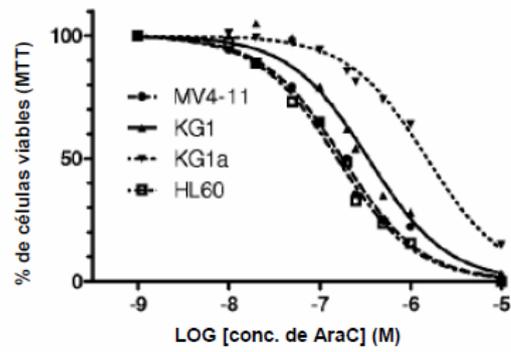
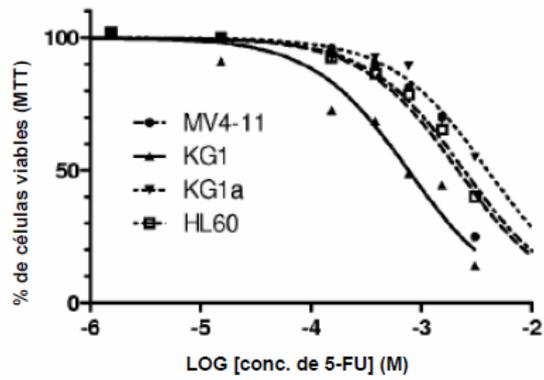


Fig. 2



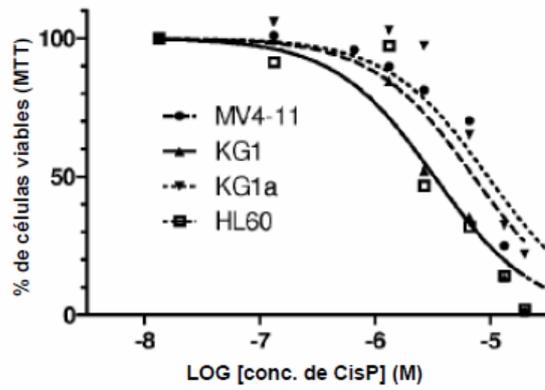


Fig. 4

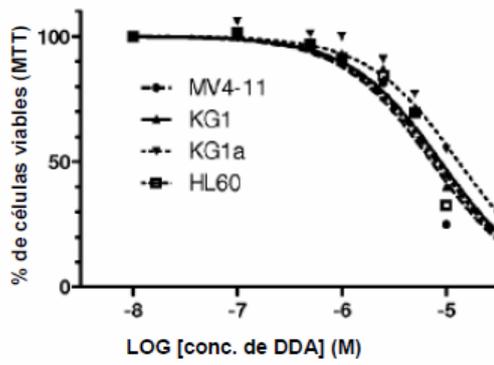


Fig. 5

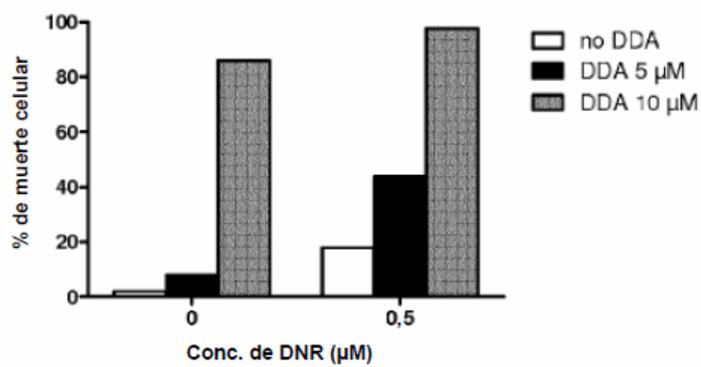


Fig. 6 A

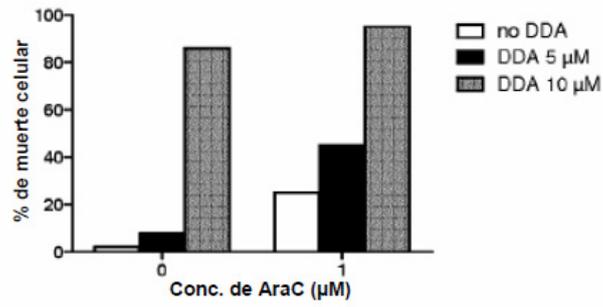


Fig. 6 B

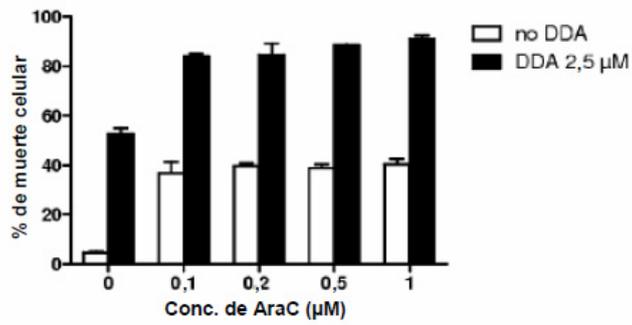


Fig. 7 A

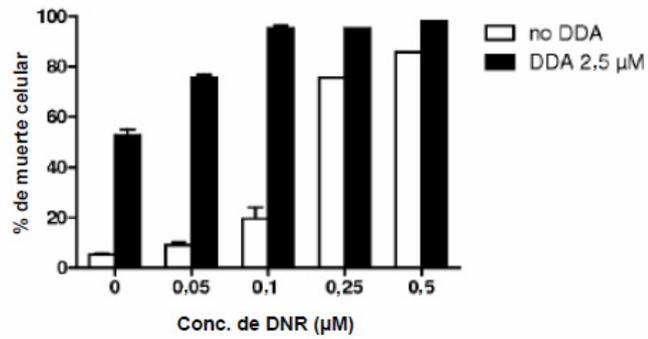


Fig. 7 B

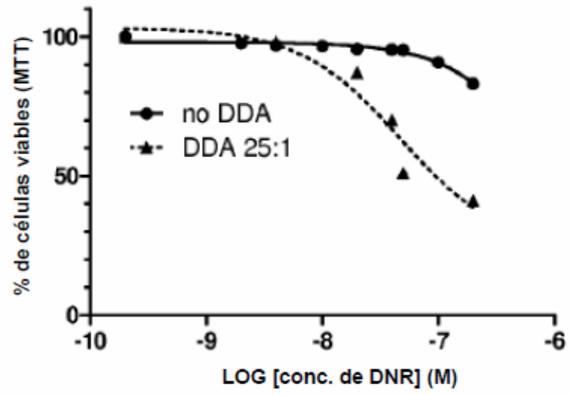


Fig. 8 A

DDA/DNR
25:1

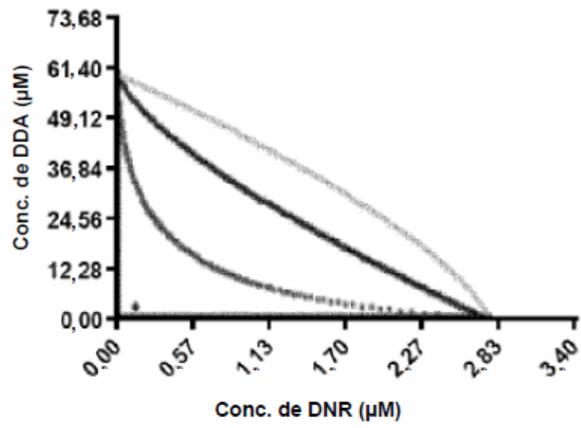


Fig. 8 B

DDA/DNR
25:1

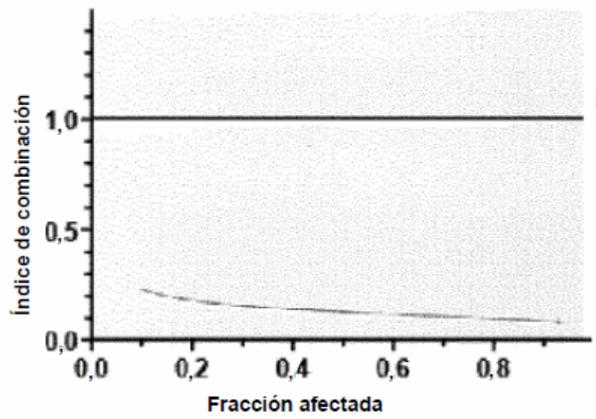


Fig. 8 C

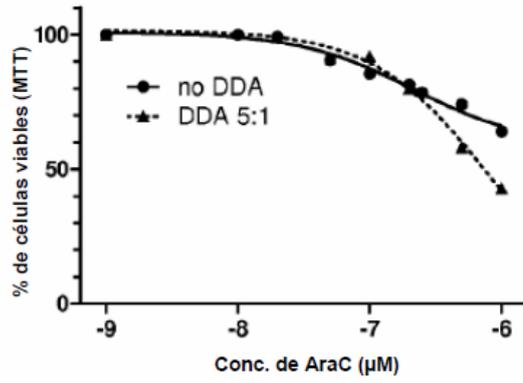


Fig. 9 A

DDA/AraC
5:1

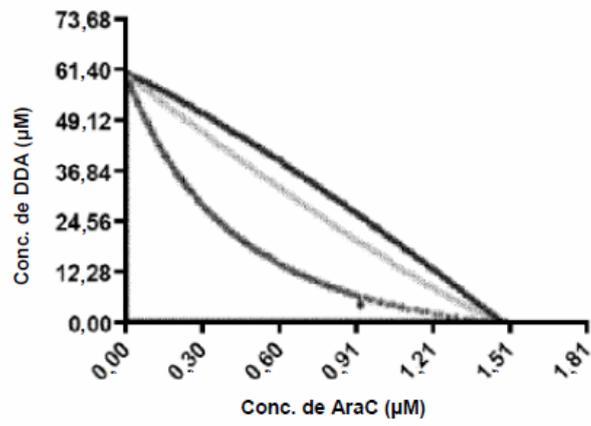


Fig. 9 B

DDA/AraC
5:1

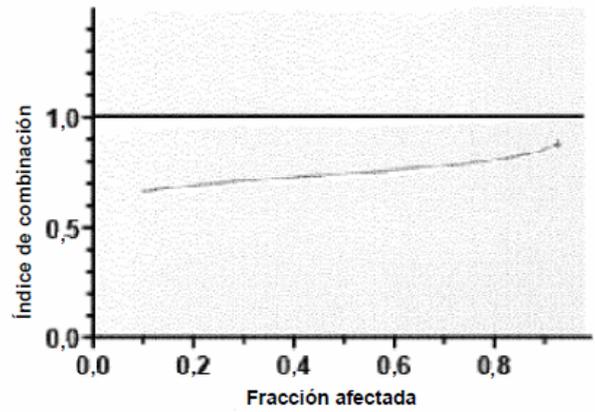
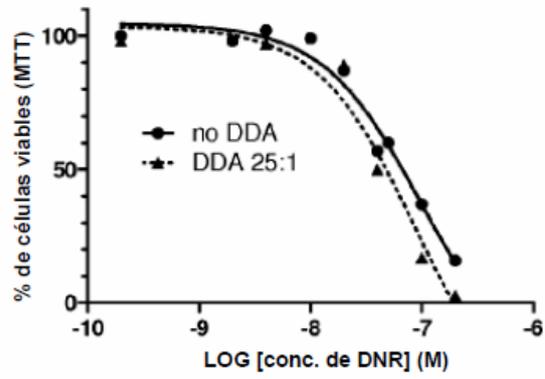
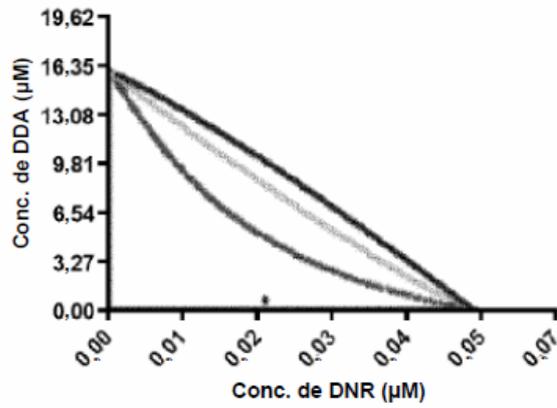


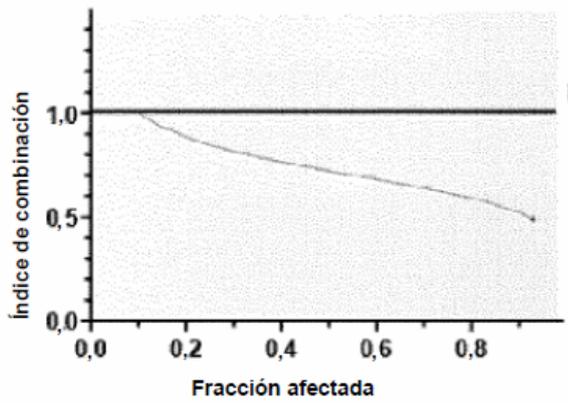
Fig. 9 C



DDA/DNR
25:1



DDA/DNR
25:1



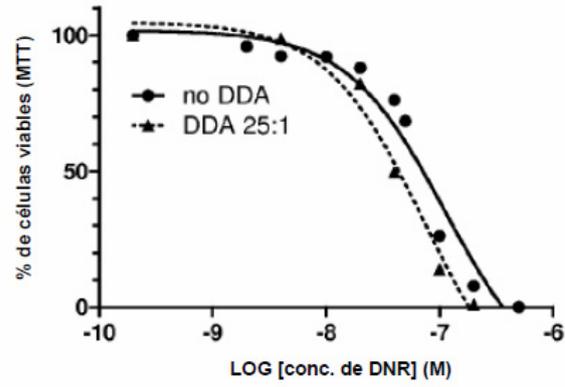


Fig. 11 A

DDA/DNR
25:1

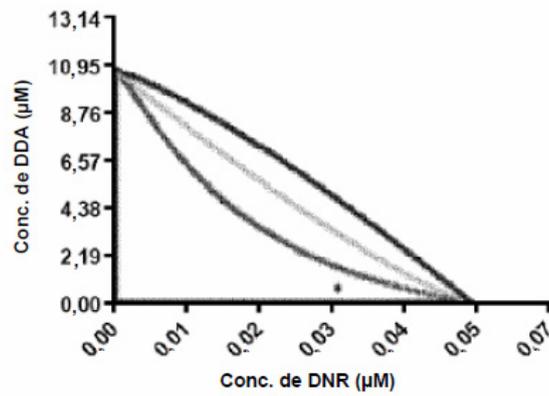


Fig. 11 B

DDA/DNR
25:1

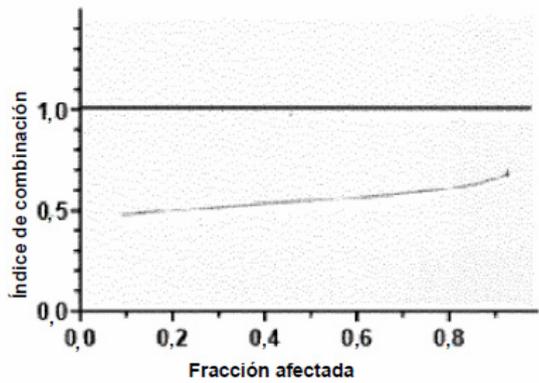


Fig. 11 C

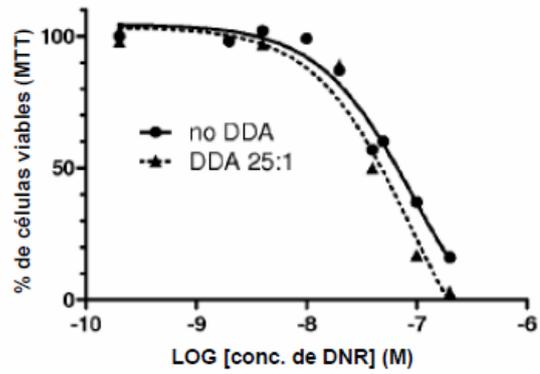


Fig. 12 A

DDA/AraC
5:1

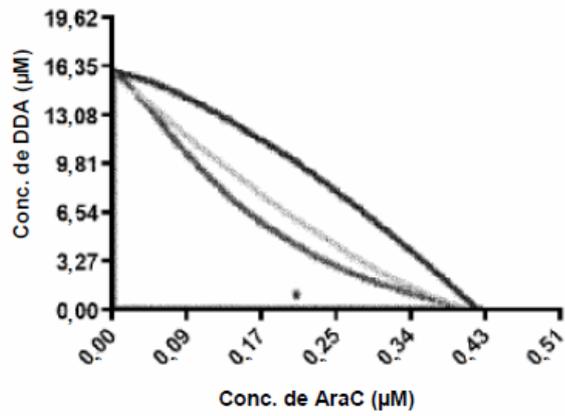


Fig. 12 B

DDA/AraC
5:1

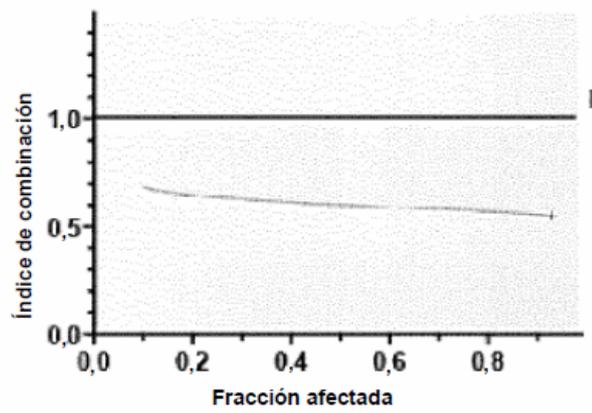


Fig. 12 C

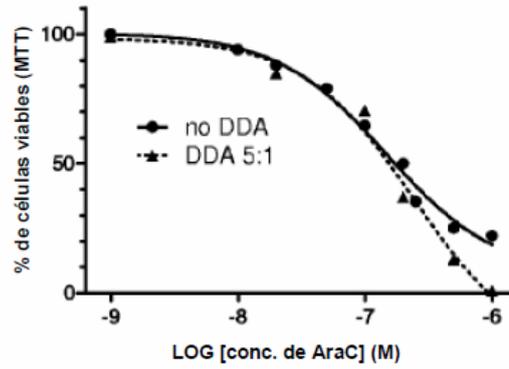


Fig. 13 A

DDA/AraC
5:1

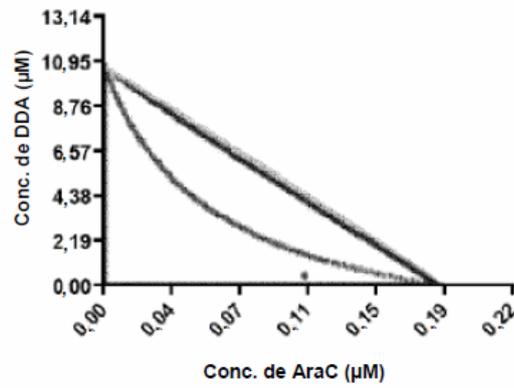


Fig. 13 B

DDA/AraC
5:1

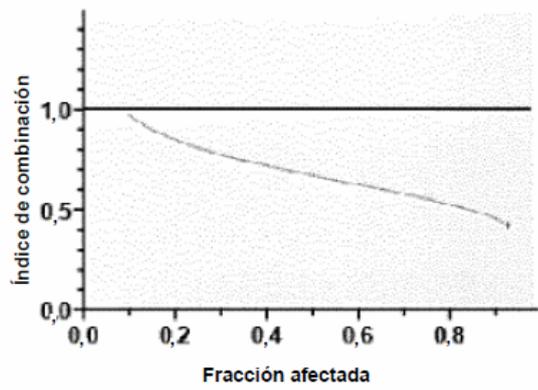


Fig. 13 C

Proporción de DDA/5FU de 1:154

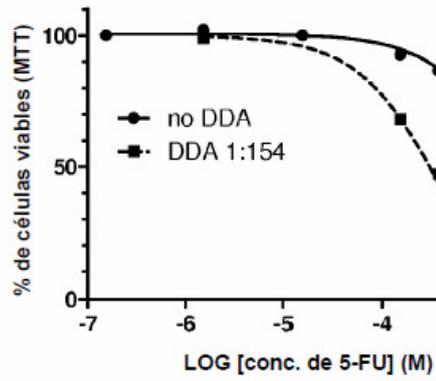


Fig. 14 A

Proporción de DDA/5FU de 1:154

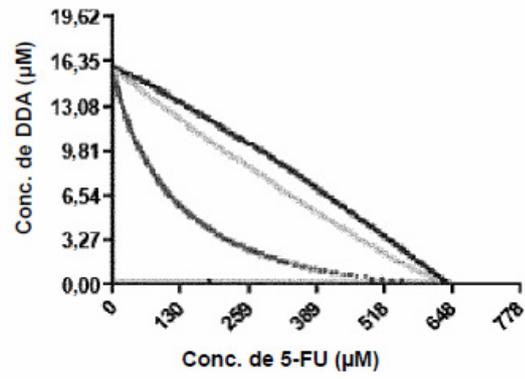


Fig. 14 B

Proporción de DDA/5FU de 1:154

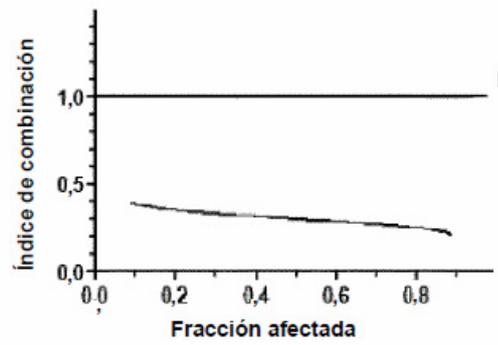


Fig. 14 C

Proporción de DDA/5FU de 1:154

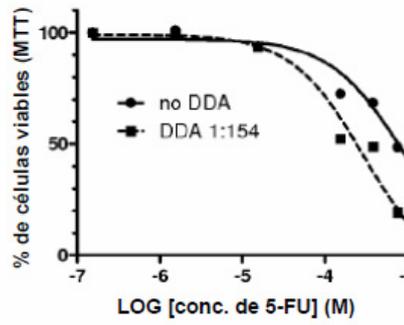


Fig. 15 A

Proporción de DDA/5FU de 1:154

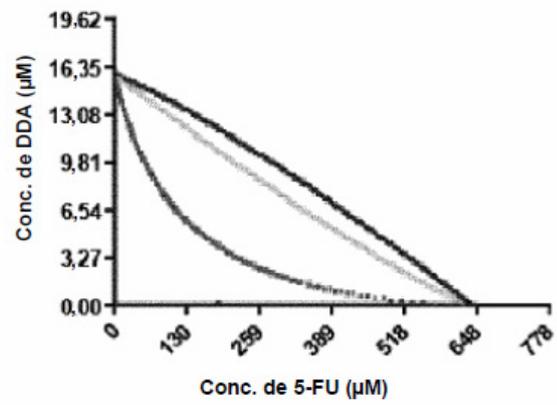


Fig. 15 B

Proporción de DDA/5FU de 1:154

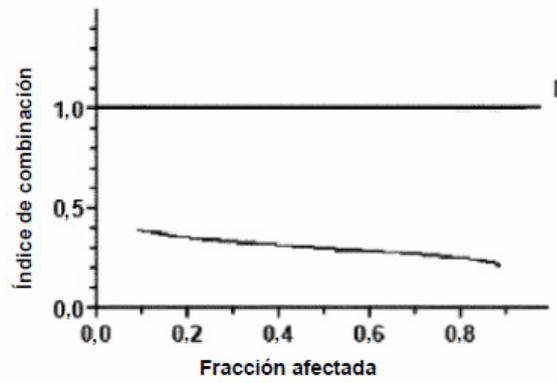


Fig. 15 C

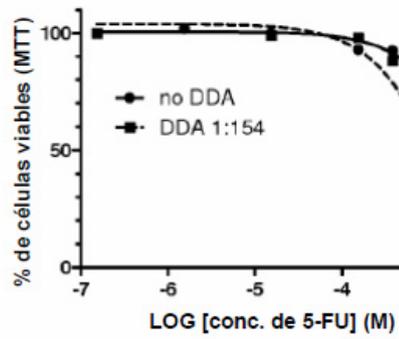


Fig. 16 A

Proporción de DDA/5FU de 1:154

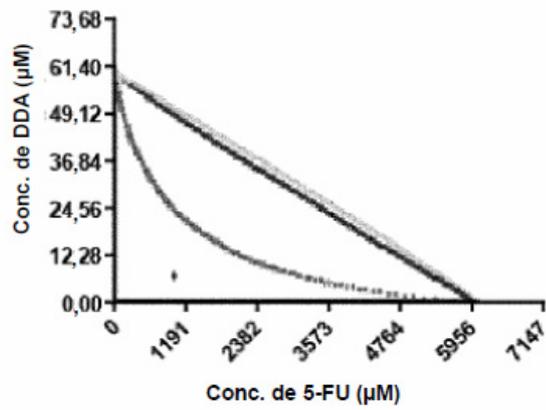


Fig. 16 B

Proporción de DDA/5FU de 1:154

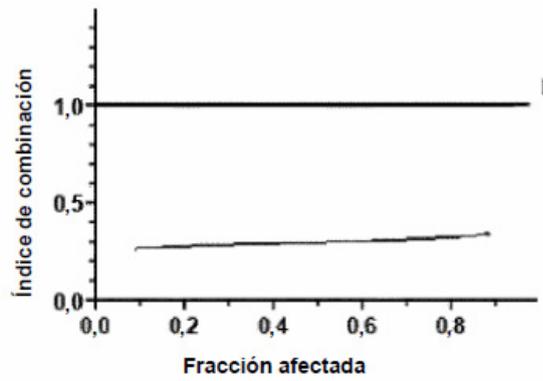


Fig. 16 C

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

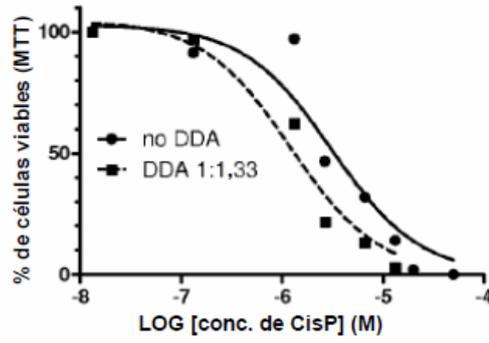


Fig. 17 A

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

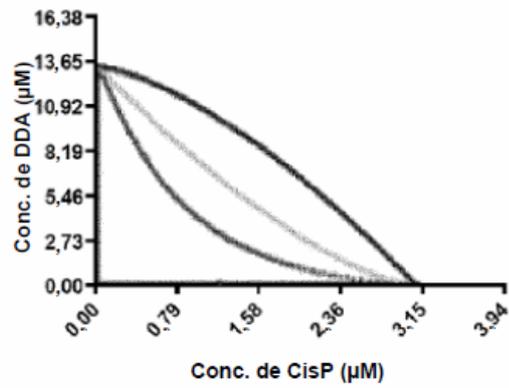


Fig. 17 B

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

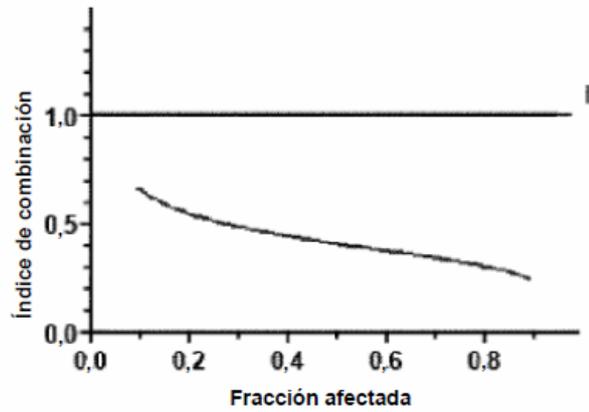


Fig. 17 C

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

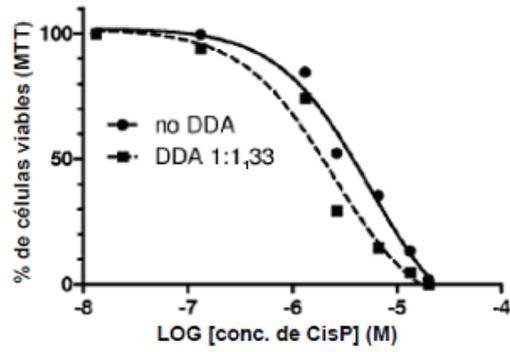


Fig. 18 A

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

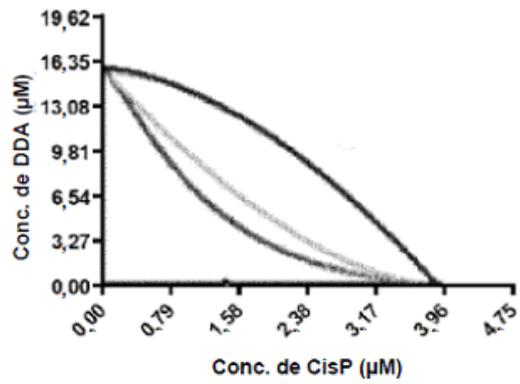


Fig. 18 B

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

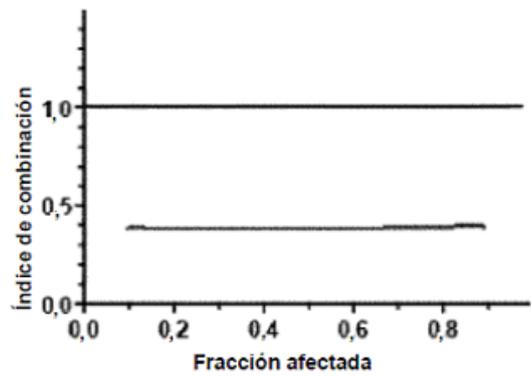


Fig. 18 C

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

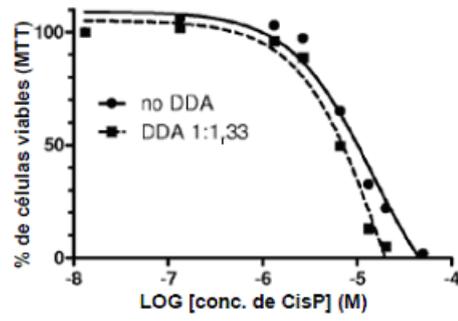


Fig. 19 A

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

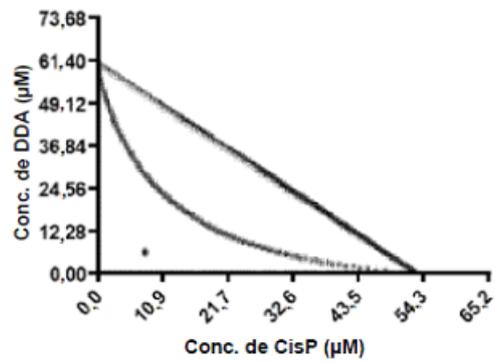


Fig. 19 B

Proporción de DDA/CisP de 1:1,33

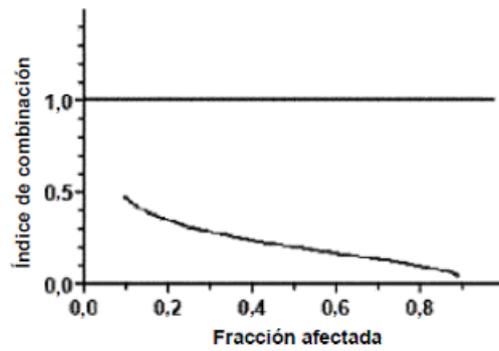
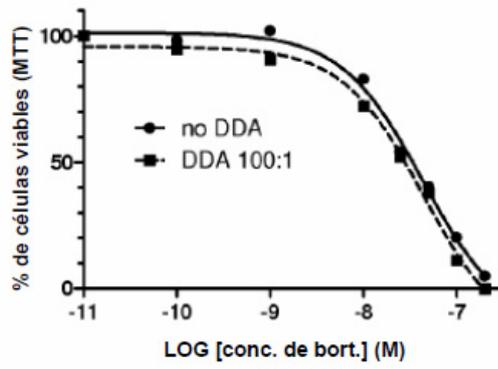
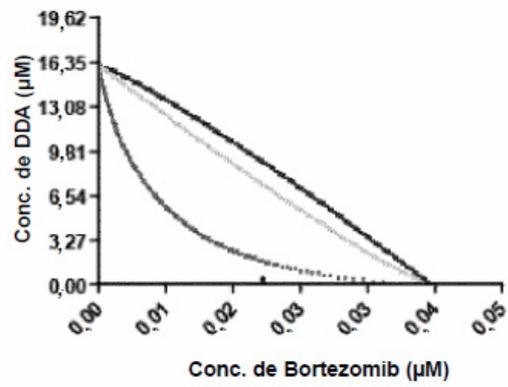


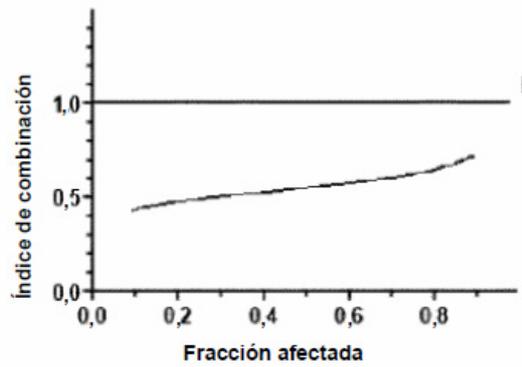
Fig. 19 C



Proporción de DDA/Bortezomib de 100:1



Proporción de DDA/Bortezomib de 100:1



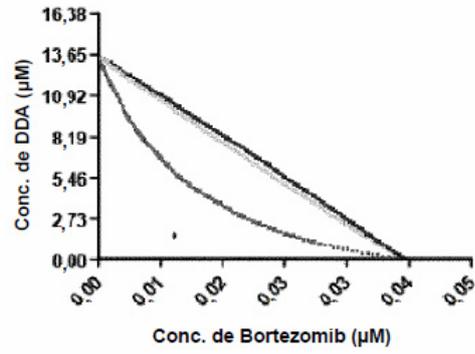


Fig. 21 A

Proporción de DDA/Bortezomib de 100:1

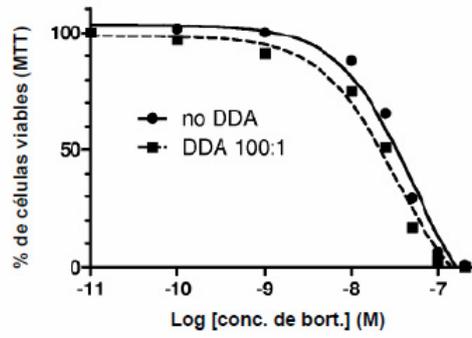


Fig. 21 B

Proporción de DDA/Bortezomib de 100:1

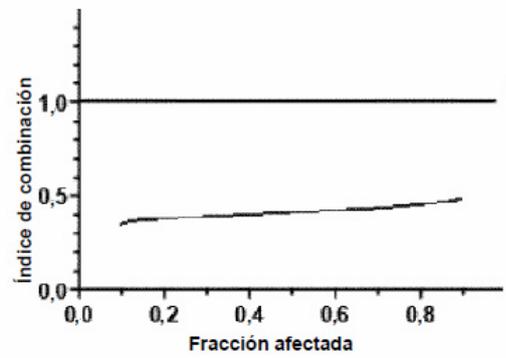


Fig. 21 C

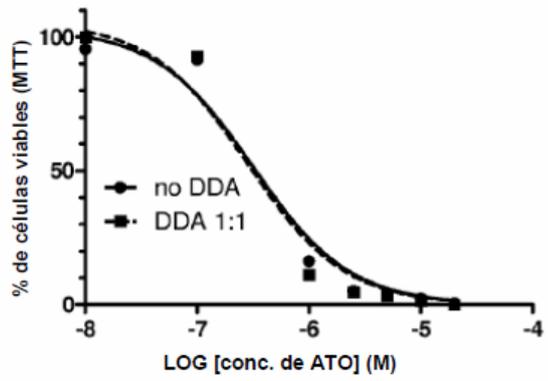


Fig. 22 A

DDA/trióxido de arsénico de 1:1

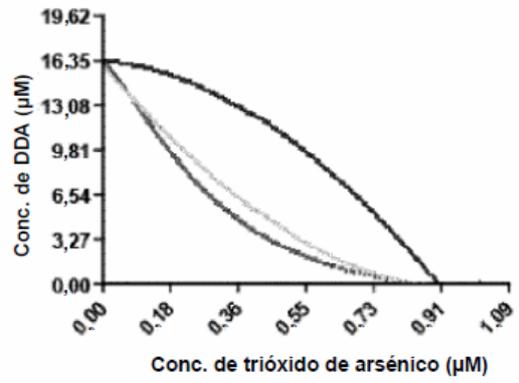


Fig. 22 B

DDA/trióxido de arsénico de 1:1

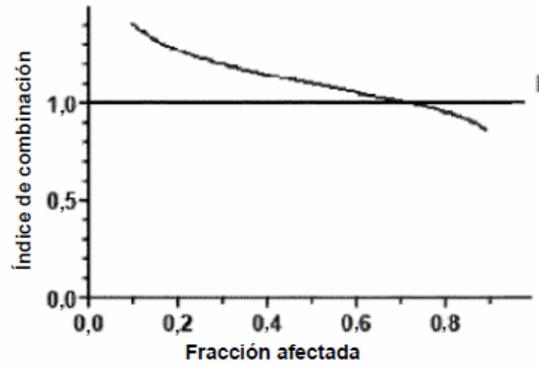


Fig. 22 C

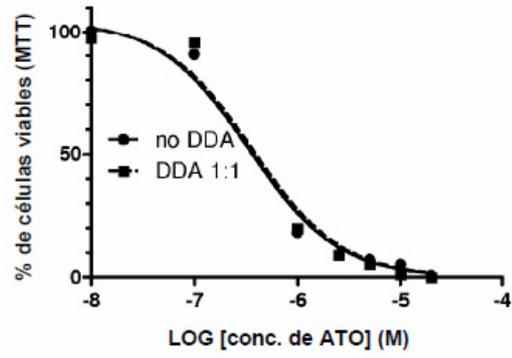


Fig. 23 A

DDA/trióxido de arsénico de 1:1

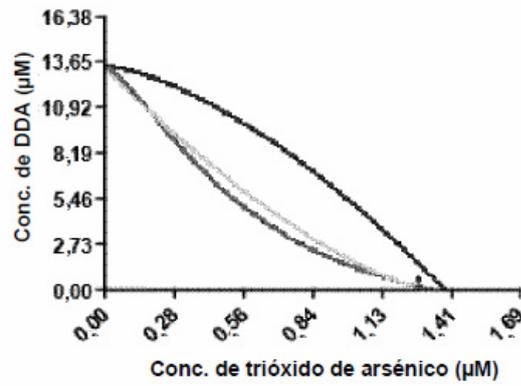


Fig. 23 B

DDA/trióxido de arsénico de 1:1

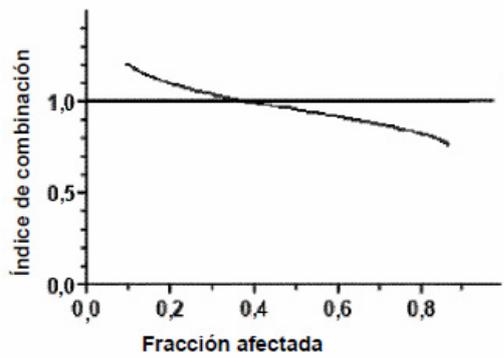


Fig. 23 C

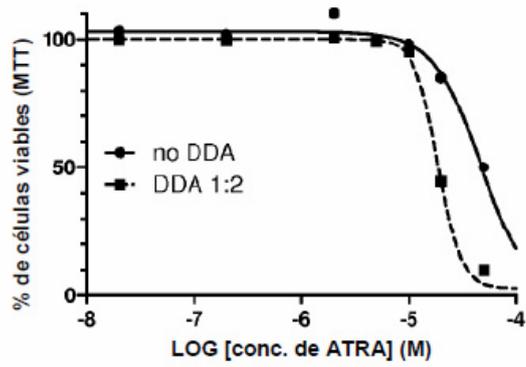


Fig. 24 A

DDA/ATRA 1:2

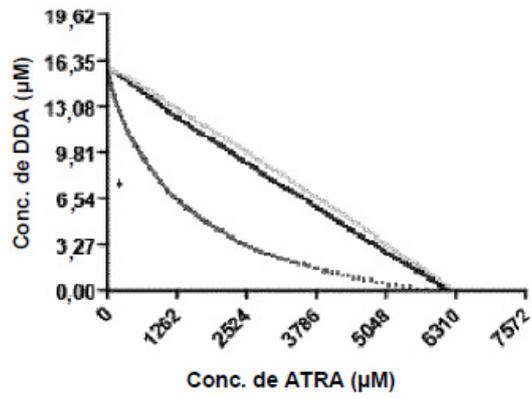


Fig. 24 B

DDA/ATRA 1:2

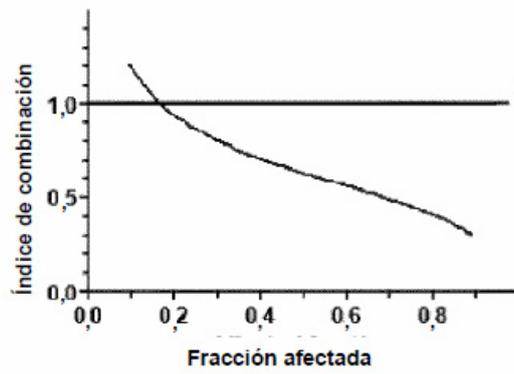


Fig. 24 C

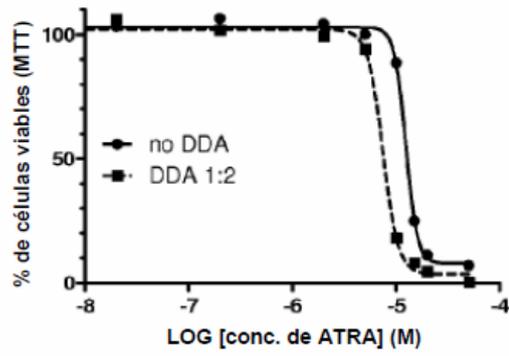


Fig. 25 A

DDA/ATRA 1:2

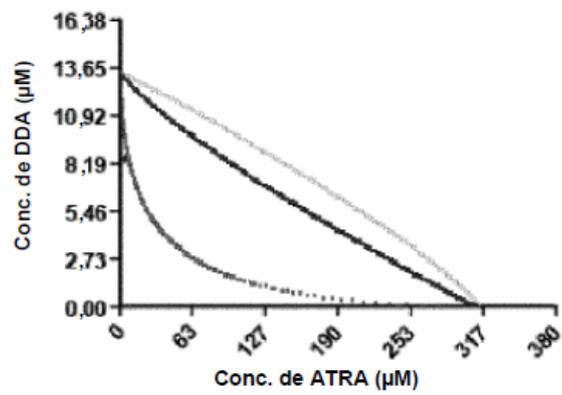


Fig. 25 B

DDA/ATRA 1:2

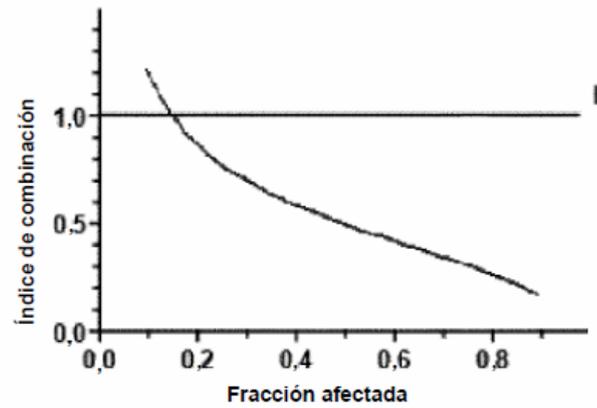


Fig. 25 C

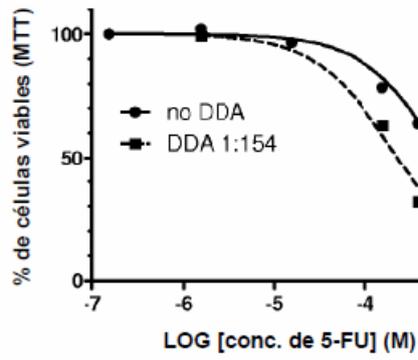


Fig. 26 A

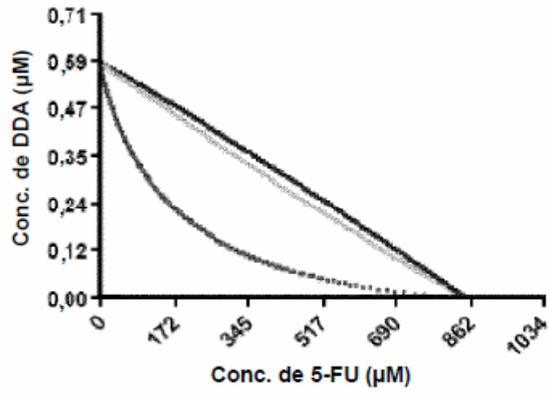


Fig. 26 B

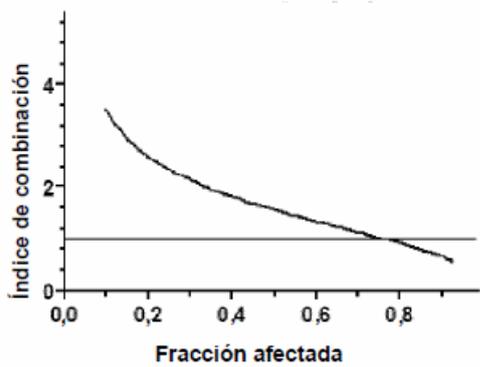


Fig. 26 C

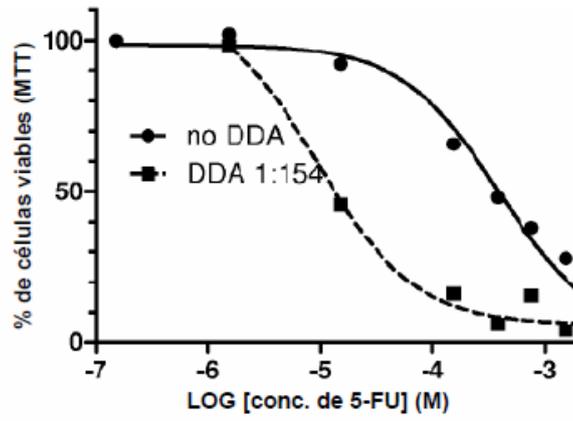


Fig. 27 A

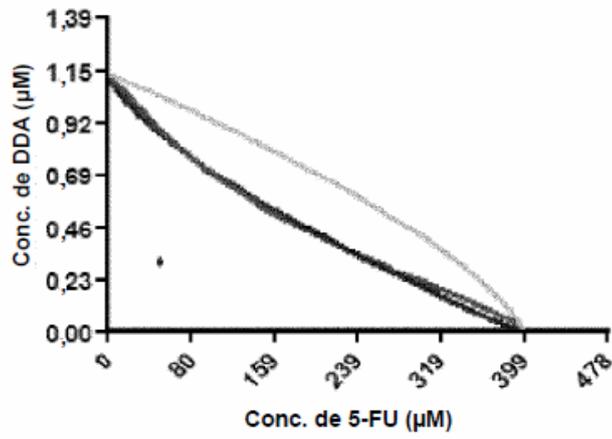


Fig. 27 B

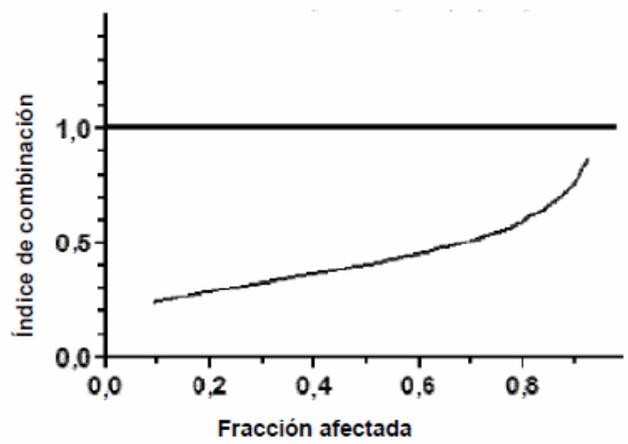


Fig. 27 C

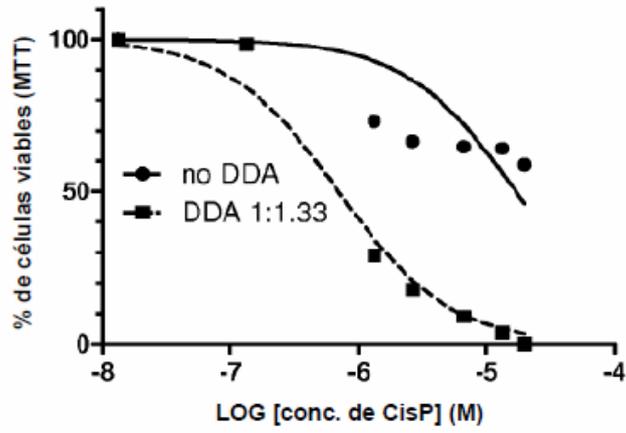


Fig. 28 A

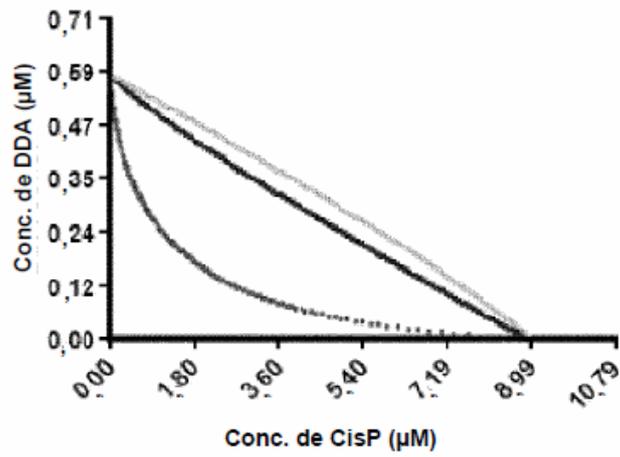


Fig. 28 B

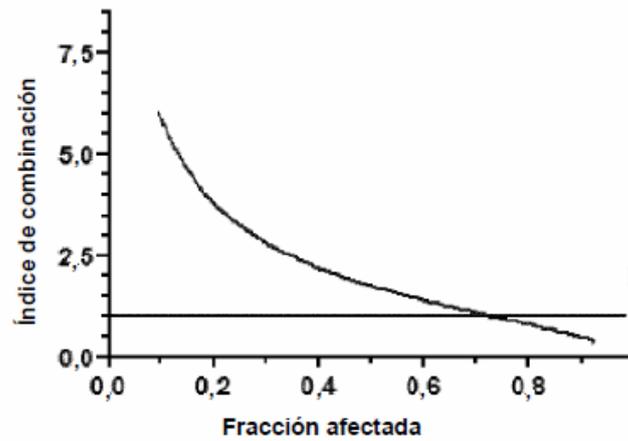


Fig. 28 C

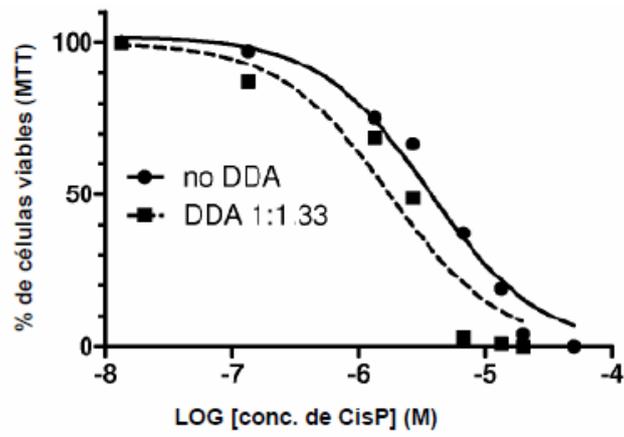


Fig. 29 A

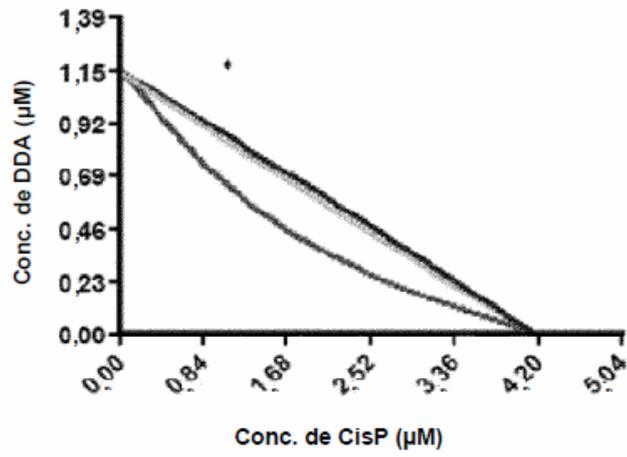


Fig. 29 B

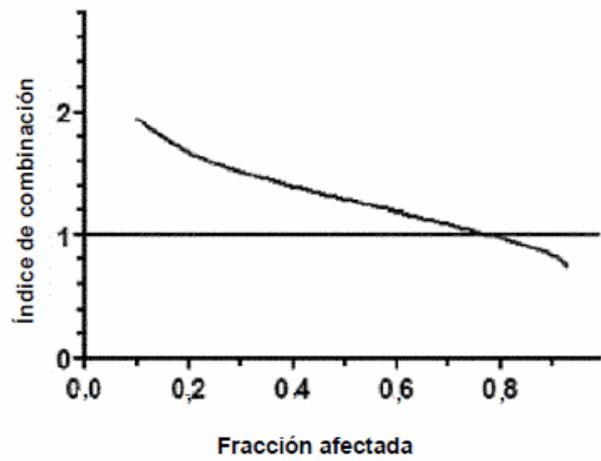


Fig. 29 C

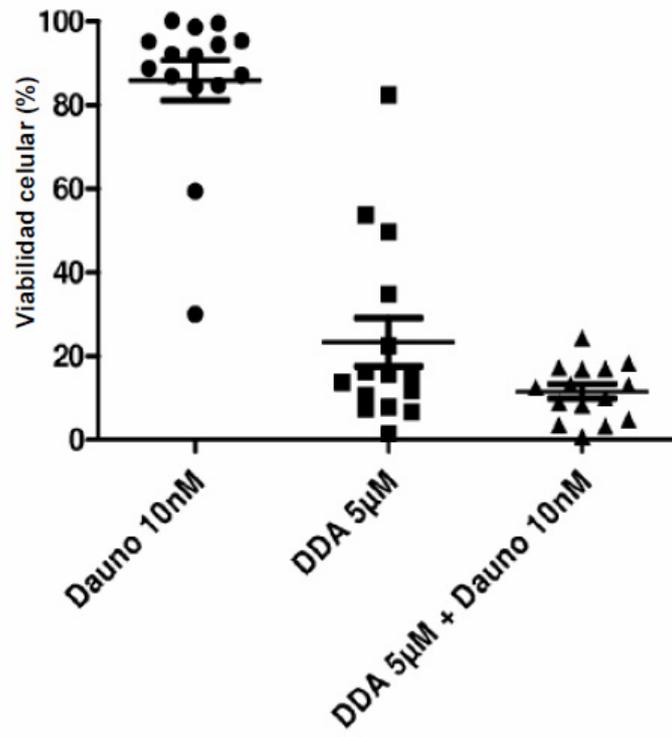


Fig. 30