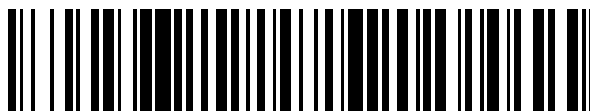


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 052**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4995 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 38/15 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 14175259 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2786753**

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

30 Prioridad:

12.11.2010 EP 10382300

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

08.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 719 052 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación con un antibiótico antitumoral

5 **Campo de la invención**

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

10 **Antecedentes de la invención**

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

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

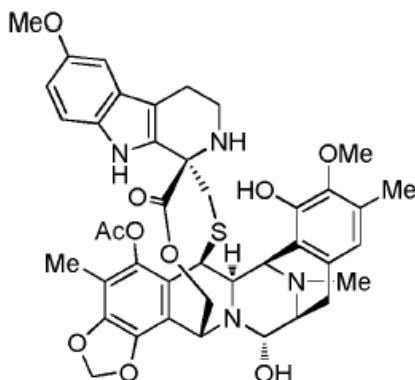
Se dispone de muchos tratamientos para el cáncer, incluyendo la cirugía y la radiación para una enfermedad localizada, y la quimioterapia. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos disponibles para muchos tipos de cáncer es limitada, y se necesitan nuevas formas de tratamiento mejoradas que muestren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

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

La quimioterapia, en su forma clásica, se ha centrado principalmente en destruir rápidamente las células cancerosas proliferantes dirigiéndose a procesos metabólicos celulares generales, incluyendo la biosíntesis de ADN, ARN y de proteínas. Los fármacos quimioterapéuticos se dividen en varios grupos en función de cómo afectan a sustancias químicas específicas en las células cancerosas, con cuáles actividades o procesos celulares interfiere el fármaco y a qué fases específicas del ciclo celular afecta el fármaco. Los tipos de fármacos quimioterapéuticos más comúnmente usados incluyen: fármacos alquilantes de ADN (tales como ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatino, carboplatino, dacarbazina), antimetabolitos (5-fluorouracilo, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina), inhibidores mitóticos (tales como paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina), antibióticos anticancerosos (tales como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona), inhibidores de topoisomerasa I y/o II (tales como topotecán, irinotecán, etopósido y tenipósido) y terapia hormonal (tal como tamoxifeno y flutamida).

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

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



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

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

Sumario de la invención

La presente invención establece que PM01183 potencia la actividad antitumoral de antibióticos anticancerosos, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D. Por lo tanto, PM01183 y dichos otros antibióticos anticancerosos pueden usarse satisfactoriamente en terapia de combinación para el tratamiento del cáncer.

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

En la presente memoria se dan a conocer terapias de combinación eficaces para el tratamiento del cáncer basadas en PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el uso de otros fármacos anticancerosos seleccionados de un antibiótico anticanceroso como se define anteriormente.

De acuerdo con un aspecto de esta invención, la invención está dirigida a PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación sinérgica con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico anticanceroso seleccionado de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.

En otro aspecto, la invención está dirigida a PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el aumento de la eficacia terapéutica de un antibiótico anticanceroso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación sinérgica con este otro antibiótico anticanceroso, en donde el antibiótico anticanceroso se selecciona de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.

Se da a conocer el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer por terapia de combinación empleando PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un antibiótico anticanceroso.

Se da a conocer una composición farmacéutica que comprende PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un antibiótico anticanceroso, y un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en terapia de combinación para el tratamiento del cáncer.

La invención engloba también un kit para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende una forma de dosificación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una forma de dosificación de un

antibiótico anticanceroso seleccionado de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D, e instrucciones para el uso de ambos fármacos en combinación sinérgica.

5 Se dan a conocer combinaciones sinérgicas de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un antibiótico anticanceroso seleccionado de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.

Breve descripción de las figuras

10 **Fig. 1-3.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, mitomicina C y actinomicina D respectivamente, contra células A549.

15 **Fig. 4-6.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, mitomicina C y actinomicina D respectivamente, contra células A673.

Fig. 7-9. Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina y mitomicina C respectivamente, contra células SK-MEL-2.

20 **Fig. 10-13.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C y actinomicina D respectivamente, contra células PC-3.

Fig. 14-16. Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina y actinomicina D respectivamente, contra células PANC-1.

25 **Fig. 17-19.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina y actinomicina D respectivamente, contra células HGC-27.

Fig. 20-23. Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D y mitomicina C respectivamente, contra células IGROV-1.

30 **Fig. 24-25.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina y doxorubicina respectivamente, contra células HEP-G2.

35 **Fig. 26-29.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D y mitomicina C respectivamente, contra células MDA-MB-231.

Fig. 30-33. Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D y mitomicina C respectivamente, contra células HT-29.

40 **Fig. 34-37.** Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina, doxorubicina, actinomicina D y mitomicina C respectivamente, contra células RXF-393.

Fig. 38-39. Datos de actividad *in vitro* de PM01183 en combinación con daunorrubicina y doxorubicina respectivamente, contra células U87-MG.

45 **Fig. 40.** Evaluación del volumen tumoral de tumores A2780 en ratones tratados con placebo, PM01183, doxorubicina y PM01183 más doxorubicina.

50 **Fig. 41.** Efectos de la combinación de PM01183 con daunorrubicina en la línea celular JURKAT.

Fig. 42. Efectos de la combinación de PM01183 con daunorrubicina en la línea celular RAMOS

Fig. 43. Efectos de la combinación de PM01183 con daunorrubicina en la línea celular U-937.

55 Descripción detallada de la invención

60 El alcance de la invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia objeto fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos. Cualquier referencia citada en la descripción con respecto a procedimientos de tratamiento se refiere a compuestos, a composiciones farmacéuticas y a medicamentos de la presente invención para su uso mediante terapia en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal).

65 Sorprendentemente encontramos que PM01183 potencia en gran medida la actividad anticancerosa de los antibióticos anticancerosos daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D cuando estos fármacos anticancerosos se combinaban con PM01183. Por tanto, la presente invención está dirigida a proporcionar un tratamiento eficaz del cáncer basado en la combinación de PM01183, o

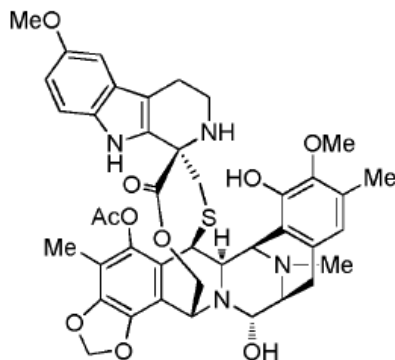
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un antibiótico anticanceroso seleccionado de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.

5 En la presente solicitud, por "cáncer" se entiende la inclusión de tumores, neoplasias y cualquier otra enfermedad maligna que tenga como causa tejido maligno o células malignas.

10 El término "tratar", como se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, significa invertir, aliviar o inhibir la progresión de la enfermedad o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria y a menos que se indique otra cosa, se refiere al acto de tratar, tal y como acaba de definirse con anterioridad con el término "tratamiento".

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

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



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

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

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

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

Además, puede prepararse PM01183 para su uso de acuerdo con la presente invención siguiendo el proceso sintético como el que se da a conocer en el documento WO 03/014127.

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

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

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

En la presente invención se prefiere particularmente la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con antibióticos anticancerosos, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D, en el tratamiento del cáncer.

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

En una realización preferida, la invención se dirige a la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un antibiótico anticanceroso seleccionado de daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D en el tratamiento del cáncer, y más particularmente en el tratamiento de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, cáncer anal, leucemia y linfoma. Se prefiere particularmente la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina C y actinomicina D en el tratamiento del cáncer, y más particularmente en el tratamiento de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, leucemia y linfoma.

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

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

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

La invención da a conocer un procedimiento para aumentar o potenciar la eficacia terapéutica de un antibiótico anticanceroso seleccionado del listado de fármacos dado anteriormente en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con este otro fármaco anticanceroso. Puede obtenerse una indicación del aumento o la potenciación de la eficacia terapéutica ensayando las combinaciones y analizando los resultados, por ejemplo, la inhibición del crecimiento tumoral. Esta inhibición del crecimiento tumoral puede valorarse comparando el volumen tumoral medio del tratamiento que combina los dos fármacos (PM01183 y el otro fármaco) con los del tratamiento de monoterapia del otro fármaco. A este respecto, se determina el aumento o la potenciación de la eficacia terapéutica cuando la respuesta de la terapia de combinación es mayor que la mejor respuesta del fármaco más activo administrado como un agente único (monoterapia) con el mismo programa y dosis que se usa en la terapia de combinación. Este aspecto de la invención se ilustra adicionalmente en la sección de Ejemplos, específicamente en el Ejemplo 13.

La invención da a conocer el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer por terapia de combinación que emplea PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

En otro aspecto, la invención se dirige a PM01183, o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

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

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

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

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

Además, dependiendo del tipo de tumor y de la fase de desarrollo de la enfermedad, los efectos anticancerosos de los tratamientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la inhibición del crecimiento tumoral, el retraso del crecimiento tumoral, la regresión del tumor y contracción del mismo, el tiempo aumentado de nuevo crecimiento del tumor después de suspender el tratamiento, reducción de la progresión de la enfermedad y prevención de metástasis. Se espera que, cuando un tratamiento de la presente invención se administre a un paciente, tal como un paciente humano que necesite dicho tratamiento, dicho tratamiento produzca un efecto medido, por ejemplo, por la extensión del efecto anticanceroso, la velocidad de respuesta, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad o la tasa de supervivencia. En particular, los tratamientos de la invención son adecuados para pacientes humanos, especialmente aquellos que reinciden o que son resistentes a quimioterapia previa. También se contempla terapia de primera línea.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un kit para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende un suministro de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en unidades de dosificación durante al menos un ciclo, e instrucciones impresas para el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente en combinación.

5 En un aspecto relacionado, la presente invención está dirigida a un kit para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende un suministro de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en unidades de dosificación durante al menos un ciclo, un suministro de un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente en unidades de dosificación durante al menos un ciclo, e instrucciones impresas para el uso de ambos fármacos en combinación.

10 En otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en combinación con un inhibidor mitótico seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente en el tratamiento del cáncer.

15 En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un inhibidor mitótico seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica es preferible para su uso en el tratamiento del cáncer.

20 En otro aspecto, la invención proporciona adicionalmente el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de una composición para su uso en combinación con un inhibidor mitótico seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente en el tratamiento del cáncer.

25 En otro aspecto, la invención proporciona adicionalmente el uso de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el tratamiento del cáncer, en terapia de combinación con un inhibidor mitótico seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

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

40 Por ejemplo, la combinación inhibe la proliferación o la supervivencia de las células cancerosas puestas en contacto. Un nivel más bajo de proliferación o supervivencia de las células cancerosas puestas en contacto, en comparación con las células cancerosas no puestas en contacto, confirma que la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor mitótico seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente, es eficaz para tratar a un paciente con cáncer.

45 La invención da a conocer un procedimiento para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con una cantidad eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

50 La invención da a conocer un procedimiento para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con una combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente, en el que dicha combinación proporciona una inhibición mejorada frente al crecimiento de células cancerosas en comparación con (i) PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en ausencia del antibiótico anticanceroso, o (ii) el antibiótico anticanceroso en ausencia de PM01183.

55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación sinérgica de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente, para inhibir el crecimiento de células cancerosas, donde dicha combinación proporciona una inhibición mejorada frente al crecimiento de células cancerosas en comparación con (i) PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en ausencia del inhibidor mitótico, o (ii) el antibiótico anticanceroso en ausencia de PM01183.

60 En otra divulgación, la combinación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente, inhibe el crecimiento tumoral o reduce el tamaño del tumor *in vivo*. En particular, la combinación inhibe el crecimiento y/o reduce *in vivo* el tamaño de un carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma y mieloma. Preferiblemente, la combinación inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* de tumores de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, de vejiga, próstata, páncreas, tiroides, gástrico, de ovario,

hepatoma, de mama, colorrectal, de riñón, esofágico, neuroblastoma, de cerebro, cervicouterino, anal, testicular, leucemia, mieloma múltiple y linfoma.

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

Por lo tanto, la invención da a conocer un procedimiento para reducir el tamaño de un tumor, que comprende administrar una cantidad eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

La invención da a conocer un procedimiento para inhibir el crecimiento tumoral, que comprende administrar una cantidad eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un antibiótico anticanceroso seleccionado de la lista de fármacos dada anteriormente.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

EJEMPLOS

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

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

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a -20 °C), daunorrubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

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

El cribado se efectuó en dos partes:

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

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

En la tabla 1 se muestran los valores de CI₅₀ (exposición a fármaco de 72 horas) de cada agente individual para la línea celular tumoral A549.

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

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	3,60 x 10 ⁻⁹
Daunorrubicina	3,55 x 10 ⁻⁷
Mitomicina C	2,49 x 10 ⁻⁴
Actinomicina D	4,70 x 10 ⁻⁹

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

CI_{50} de PM01183	CI_{50} de agente
100 %	0 %
75 %	25 %
70 %	30 %
60 %	40 %
50 %	50 %
40 %	60 %
30 %	70 %
25 %	75 %
0 %	100 %

- 10 Como ayuda visual, los valores de respuesta se representaron en una gráfica de dispersión, dando las relaciones de dosis en el eje x y el % de los valores de respuesta en el eje y. Se trazó una línea horizontal entre los dos valores de respuesta de criterio de valoración (p.ej., entre los valores de respuesta de 100 % de CI_{50} de PM01183 y 100 % de CI_{50} de agente quimioterapéutico estándar). En los casos en los que los valores de respuesta en los dos puntos de criterio de valoración fueran aproximadamente equivalentes, los puntos por encima o por debajo de esta línea de aditividad prevista podían interpretarse como representantes de una interacción farmacológica antagonista o sinérgica, respectivamente.

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma pulmonar humano A549:

- 25 La combinación de PM0183 con daunorrubicina (Figura 1), de PM01183 con mitomicina C (Figura 2) y de PM01183 con actinomicina D (Figura 3), mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

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

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

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a -20 °C), daunorrubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

40 La línea celular A673 fue la línea celular de rdbomiosarcoma humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células A673 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina a 37 °C con CO₂ al 5 % y una humedad del 95 %.

El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:

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

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

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

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,20 \times 10^{-9}$
Daunorrubicina	$5,20 \times 10^{-7}$

Mitomicina C	$2,99 \times 10^{-6}$
Actinomicina D	$9,56 \times 10^{-10}$

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

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de sarcoma humano A673:

La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 4) y de PM01183 con actinomicina D (Figura 6) mostraba sinergia a casi todas las relaciones de dosis, mientras que la combinación de PM01183 con mitomicina C (Figura 5) exhibía fuerte sinergia.

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

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

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), doxorubicina y daunorrubicina (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 μl de cada compuesto diluido por pocillo.

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

El cribado se efectuó en dos partes como se indica en el ejemplo 1:

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

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

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

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,00 \times 10^{-9}$
Daunorrubicina	$1,77 \times 10^{-7}$
Doxorrubicina	$3,00 \times 10^{-7}$
Mitomicina C	$9,00 \times 10^{-7}$

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales SK-MEL-2 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente a la misma combinación de concentraciones de CI_{50} únicas que las descritas en el ejemplo 1.

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de melanoma humano SK-MEL-2:

La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 7) y de PM01183 con doxorubicina (Figura 8) mostró sinergia a casi todas las relaciones de dosis, mientras que la combinación de PM01183 con mitomicina C (Figura 9) exhibió fuerte sinergia.

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

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

Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a -20 °C), daunorrubicina, doxorubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

La línea celular PC-3 fue la línea celular de adenocarcinoma de próstata humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células PC-3 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C con CO₂ al 5 % y una humedad del 95 %.

El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral PC-3.

Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral PC-3 usando la misma metodología indicada en el ejemplo 1, y se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	2,60 x 10 ⁻⁹
Daunorrubicina	1,15 x 10 ⁻⁶
Doxorubicina	1,48 x 10 ⁻⁶
Mitomicina C	1,00 x 10 ⁻⁵
Actinomicina D	1,00 x 10 ⁻⁸

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron las células tumorales humanas PC-3 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones de CI₅₀ únicas que las descritas en el ejemplo 1.

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de cáncer de próstata humana PC-3:

La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 10) y de PM01183 con doxorubicina (Figura 11) exhibía fuere sinergia. La combinación de PM01183 con mitomicina C (Figura 12) y de PM01183 con actinomicina D (Figura 13) mostró sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

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

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

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

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

El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:

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

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

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

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	2,80 x 10 ⁻⁹
Daunorrubicina	8,69 x 10 ⁻⁷
Doxorrubicina	3,45 x 10 ⁻⁶
Actinomicina D	2,20 x 10 ⁻⁸

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

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma de páncreas humano PANC-1:

La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 14) y de PM01183 con doxorubicina (Figura 15) exhibió sinergia, mientras que la combinación de PM01183 con actinomicina D (Figura 16) mostró sinergia a las relaciones de dosis de 75/25 y 30/70-25/75.

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

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

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

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

El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:

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

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

Tabla 6: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	8,50 x 10 ⁻¹⁰
Daunorrubicina	3,72 x 10 ⁻⁷
Doxorrubicina	5,40 x 10 ⁻⁸
Actinomicina D	3,74 x 10 ⁻⁹

b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas HGC-27 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones de CI₅₀ únicas que las descritas en el ejemplo 1.

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma gástrico humano HGC-27:

La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 17) y de PM01183 con actinomicina D (Figura 19) exhibía fuerte sinergia. La combinación de PM01183 con doxorubicina (Figura 18) exhibía sinergia a las relaciones de dosis de 75/25- 60/40.

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

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

- 5 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a -20 °C), daunorrubicina, doxorubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.
- 10 La línea celular IGROV-1 fue la línea celular de adenocarcinoma de ovario humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células IGROV-1 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C con CO₂ al 5 % y una humedad del 95 %.
- 15 El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:
- a. En un primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral IGROV-1.
- 20 Se calcularon los valores de CI₅₀ (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral IGROV-1 usando la misma metodología dada a conocer en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Valores de CI₅₀ en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	3,20 x 10 ⁻⁹
Daunorrubicina	3,55 x 10 ⁻⁷
Doxorrubicina	2,59 x 10 ⁻⁷
Actinomicina D	3,29 x 10 ⁻⁹
Mitomicina C	3,00 x 10 ⁻⁶

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

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma de ovario humano IGROV-1:

- 35 La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 20) exhibió sinergia. La combinación de PM01183 con doxorubicina (Figura 21) y de PM01183 con actinomicina D (Figura 22) exhibió sinergia a casi todas las relaciones de dosis, mientras que la combinación de PM01183 con mitomicina C (Figura 23) mostró sinergia a las relaciones de dosis de 50/50 y 30/70-25/75.

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

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

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

- 50 La línea celular HepG2 fue la línea celular de carcinoma hepático hepatocelular humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células HepG2 en medio de Eagle esencial mínimo (MEME) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C con CO₂ al 5 % y una humedad del 95 %.

- 55 El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:
- a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI₅₀ para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral HepG2.

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

Tabla 8: valores de CI_{50} en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$2,50 \times 10^{-9}$
Daunorrubicina	$3,00 \times 10^{-7}$
Doxorrubicina	$2,00 \times 10^{-7}$

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

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular hepatocelular humana HepG2:

15 La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 24) y de PM01183 con doxorrubicina (Figura 25) mostró sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

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

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

25 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), daunorrubicina, doxorrubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 μl de cada compuesto diluido por pocillo.

30 La línea celular MDA-MB-231 fue la línea celular de adenocarcinoma de mama humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células MDA-MB-231 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con CO_2 al 5 % y una humedad del 95 %.

35 El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:

a. En el primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral MDA-MB-231.

40 Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral MDAMB-231 usando la misma metodología indicada en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$3,50 \times 10^{-9}$
Daunorrubicina	$3,70 \times 10^{-7}$
Doxorrubicina	$6,00 \times 10^{-7}$
Actinomicina D	$4,54 \times 10^{-10}$
Mitomicina C	$2,00 \times 10^{-6}$

45 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas MDA-MB-231 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI_{50} que las descritas en el ejemplo 1.

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma de mama humano MDA-MB-231:

55 La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 26) y de PM01183 con mitomicina C (Figura 29) exhibió sinergia a casi todas las relaciones de dosis. La combinación de PM01183 con doxorrubicina (Figura 27) exhibió

fuerte sinergia y la combinación de PM01183 con actinomicina D (Figura 28) exhibió sinergia.

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

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

10 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a -20 °C), daunorrubicina, doxorubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

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

20 El cribado se efectuó en dos partes como se indica en el ejemplo 1:

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

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

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

Compuesto	CI ₅₀ (M)
PM01183	3,70 x 10 ⁻⁹
Daunorrubicina	5,32 x 10 ⁻⁷
Doxorrubicina	9,00 x 10 ⁻⁷
Actinomicina D	3,27 x 10 ⁻⁹
Mitomicina C	2,00 x 10 ⁻⁶

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

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

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de carcinoma colorrectal humano HT-29:

40 La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 30) y de PM01183 con mitomicina C (Figura 33) exhibió fuerte sinergia. La combinación de PM01183 con doxorubicina (Figura 31) y de PM01183 con actinomicina D (Figura 32) mostró sinergia a casi todas las relaciones de dosis.

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

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

50 Se evaluaron los siguientes agentes en combinación con PM01183: mitomicina C (soluciones madre de este compuesto preparadas en agua estéril doblemente destilada y conservadas a -20 °C), daunorrubicina, doxorubicina y actinomicina D (soluciones madre de estos compuestos preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

55 La línea celular RXF-393 fue la línea celular de carcinoma de riñón humana seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron células RXF-393 en medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementado con suero fetal bovino al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C con CO₂ al 5 % y una humedad del 95 %.

El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:

a. En un primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral RXF-393.

5 Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral RXF-393 usando la misma metodología indicada en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$5,00 \times 10^{-9}$
Daunorrubicina	$6,20 \times 10^{-7}$
Doxorrubicina	$8,00 \times 10^{-7}$
Actinomomicina D	$7,09 \times 10^{-10}$
Mitomicina C	$9,00 \times 10^{-6}$

10 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas RXF-393 con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI_{50} que las descritas en el ejemplo 1.

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

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

20 La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 34) mostró sinergia a casi todas las relaciones de dosis. La combinación de PM01183 con doxorrubicina (Figura 35) mostró sinergia a las relaciones de dosis de 75/25-60/40, mientras que la combinación de PM01183 con actinomomicina D (Figura 36) mostró sinergia a las relaciones de dosis de 75/25-70/30 y 30/70

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

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

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

35 La línea celular U87-MG fue la línea celular de glioblastoma humano seleccionada para este ensayo. Se mantuvieron las células U87-MG en medio de Eagle esencial mínimo (MEME) complementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomomicina a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad.

40 El cribado se efectuó en dos partes como indica en el ejemplo 1:

a. En un primer conjunto de ensayos, se determinaron los valores de CI_{50} para cada fármaco después de 72 horas de exposición a fármaco en la línea celular tumoral U87-MG.

45 Se calcularon los valores de CI_{50} (72 horas de exposición a fármaco) de cada agente individual para la línea celular tumoral U87-MG usando la misma metodología indicada en el ejemplo 1, y se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Valores de CI_{50} en concentración molar (M) de cada uno de los agentes

Compuesto	CI_{50} (M)
PM01183	$4,50 \times 10^{-9}$
Daunorrubicina	$2,84 \times 10^{-7}$
Doxorrubicina	$3,00 \times 10^{-7}$

50 b. En un segundo conjunto de ensayos, se incubaron células tumorales humanas U87-MG con PM01183 en combinación con cada uno de los agentes mencionados anteriormente, a la misma combinación de concentraciones únicas de CI_{50} que las descritas en el ejemplo 1.

55 Se efectuaron el cultivo celular y sembrado celular como se describe anteriormente y se midió el efecto citotóxico

mediante el ensayo de MTT como se indica en el ejemplo 1.

Según este ensayo, se encontró que, en la línea celular de glioblastoma humano U87-MG:

- 5 La combinación de PM01183 con daunorrubicina (Figura 38) mostró sinergia a casi todas las relaciones de dosis, mientras que la combinación de PM01183 con doxorubicina (Figura 39) mostró sinergia a las relaciones de dosis de 75/25 y 60/40.

10 **EJEMPLO 13.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con doxorubicina en xenoinjertos de tumores de ovario humanos.

El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad de PM01183 para potenciar la actividad antitumoral de doxorubicina usando un modelo de xenoinjerto de carcinoma de ovario humano.

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

20 El modelo tumoral usado en estos estudios fue la línea celular A2780, que se obtuvo en la European Collection of Cell Cultures (ECACC nº 93112519).

25 Se hicieron crecer las células A2780 a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640. Se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de cada animal, usando una aguja 26G y una jeringuilla de 1 cm³, 1x10⁷ células A2780 (del pase 5 *in vitro* del estudio de PM01183 y doxorubicina), en 0,05 ml de suspensión de Matrigel al 50 % de medio exento de suero al 50 %, sin antibióticos.

30 Se determinaron las medidas tumorales usando un calibre digital (Fowler Sylvac, S235PAT). Se usó la fórmula para calcular el volumen de un elipsoide prolato para estimar el volumen tumoral (mm³) a partir de medidas tumorales bidimensionales: volumen tumoral (mm³)= [L x A²] + 2, donde L es la longitud y es el mayor diámetro en mm, y A es la anchura y el menor diámetro en mm de un tumor. Suponiendo una densidad unitaria, el volumen se convirtió en peso (es decir, 1 mm³ = 1 mg). El volumen tumoral y los pesos corporales de los animales se midieron 2-3 veces por semana, partiendo del primer día de tratamiento (día 0).

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

40 Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 163,5 mm³ en el estudio de PM01183 con doxorubicina, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamientos y de control (N= 5-7/grupo) basándose en las medidas de peso corporal y volumen tumoral usando el programa informático Newlab Oncology (versión 2.25.06.00).

45 PM01183 se proporcionó en forma de viales de torta liofilizada de PM01183, que se reconstituyó con agua para infusión a una concentración de 0,2 mg/ml. Adicionalmente, la solución madre de PM01183 se diluyó en solución de glucosa para inyección al 5 % a las concentraciones de formulación de dosificación. La doxorubicina se proporcionó como un polvo sólido que contenía clorhidrato de doxorubicina, que se reconstituyó en solución salina al 0,9 %.

50 En estos experimentos, los tratamientos con PM01183 y doxorubicina, así como con placebo, se administraron por vía intravenosa una vez a la semana hasta 2 semanas consecutivas los días 0 y 7. Los grupos de nivel de dosis se administraron como agentes individuales o en combinación.

55 Para evaluar la eficacia antitumoral, se usó la comparación del volumen tumoral mediano en los grupos de tratamiento (T) con el volumen tumoral mediano en el grupo de control (T/C x 100 %). Además, se determinó la potenciación cuando la respuesta del grupo de combinación era mayor que la mejor respuesta del agente más activo administrado como un único agente (monoterapia) con el mismo programa y dosis que los usados en la terapia de combinación.

60 Finalmente, el índice de combinación (IC), que mide cuantitativamente el grado de interacciones farmacológicas, se obtuvo a partir de las fracciones afectadas por el tratamiento, Fa (definido como 1-T/C) para cada grupo experimental el último día de la medición (día 10 para el estudio de PM01183 y doxorubicina), usando el principio del efecto mediano (Chou T.C. Pharmacol. Rev. 2006, 58, 621-681).

65 En la Tabla 13 se presentan los valores de % de T/C obtenidos con PM01183 y doxorubicina administrados ambos como agentes individuales y en combinación para cada nivel de dosis, y en la Figura 40 se muestra la evaluación del volumen tumoral de tumores A2780 en ratones tratados con placebo, con PM01183, con doxorubicina y las

correspondientes combinaciones para los grupos dosificados a las dos proporciones más altas.

Tabla 13

Grupo	Dosis	Materiales de ensayo	% de T/C al día				
			0	3	5	7	10
G01 (grupo de control)	10 ml/kg	Placebo	-	-	-	-	-
G02	0,18 mg/kg	PM01183	100,9	70,2	68,5	69,3	62,1
G03	0,135 mg/kg	PM01183	102,2	82,4	86,6	89,2	82,4
G04	0,09 mg/kg	PM01183	100,2	93,3	95,2	93,5	87,7
G05	0,045 mg/kg	PM01183	100,1	98,2	98,6	97,7	90,0
G06	8,0 mg/kg	Doxorrubicina	99,5	60,8	49,8	48,1	39,4
G07	6,0 mg/kg	Doxorrubicina	99,4,0	71,0	60,3	56,8	54,3
G08	4,0 mg/kg	Doxorrubicina	102,0	82,9	75,1	75,0	68,9
G09	2,0 mg/kg	Doxorrubicina	99,8	91,5	93,1	94,2	86,2
G10	0,18 mg/kg	PM01183	99,7	47,6	32,6	30,3	21,1
	8,0 mg/kg	Doxorrubicina					
G11	0,135 mg/kg	PM01183	100,6	67,0	54,9	53,9	44,9
	6,0 mg/kg	Doxorrubicina					
G12	0,09 mg/kg	PM01183	98,3	74,7	69,0	63,1	64,4
	4,0 mg/kg	Doxorrubicina					
G13	0,045 mg/kg	PM01183	98,1	83,1	86,6	78,1	79,2
	2,0 mg/kg	Doxorrubicina					

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

Según estos ensayos, se encontró que:

- 10 El tratamiento de combinación de PM01183 y doxorrubicina era eficaz en la inhibición del crecimiento de células de ovario A2780, dando como resultado una reducción tumoral estadísticamente significativa ($P < 0,01$) en comparación con el grupo de control, con valores de T/C de 22,1 % y 44,9 % (día 10) en los dos grupos de dosis más alta. Además, la combinación de PM01183 y doxorrubicina producía valores de T/C más bajos que los del agente individual más activo en este experimento (doxorrubicina a una dosis de 8 mg/kg). Específicamente, los valores de
- 15 TC (%) de la combinación (doxorrubicina 8 mg/kg + PM01183 0,18 mg/kg) frente a doxorrubicina sola (doxorrubicina 8 mg/kg) eran de 32,6 frente a 49,8 (día 5), de 30,3 frente a 48,1 (día 7) y de 21,1 frente a 39,4 (día 10). Por lo tanto, cuando se combina PM01183 con doxorrubicina, se observa claramente una potenciación de la actividad antitumoral.
- 20 Adicionalmente, basándose en el principio del efecto mediano, la combinación de PM01183 y doxorrubicina daba como resultado valores de IC inferiores a 1 (a una Fa mayor que 0,8), indicando sinergia en ratones portadores de tumores de ovario A2780 xenoinjertados.

- 25 **EJEMPLO 14.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos en líneas celulares de leucemia humana.

Se evaluó el siguiente agente en combinación con PM01183: daunorrubicina (soluciones madre de este compuesto preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl del compuesto diluido por pocillo.

30 La línea JURKAT fue la línea celular de leucemia humana seleccionada para este ensayo, que se obtuvo en la American Type Culture Collection (ATCC). Se hicieron crecer células JURKAT en medio RPMI exento de rojo fenol complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomomicina a 37 °C, con CO₂ al 5 % y humedad del 95 %.

35 El cribado se efectuó en dos partes

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

40

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

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

15 En la tabla 14 se muestran los valores de CE₅₀ individuales obtenidos para cada fármaco.

Tabla 14: Valores de CE₅₀ en concentración molar (M) de cada uno de los agentes para la línea celular tumoral JURKAT.

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Daunorrubicina	7,92 x 10 ⁻⁷
PM01183	1,55 x 10 ⁻⁹

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

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

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

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

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

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

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

55 En la figura 41 se muestra el efecto de las combinaciones farmacológicas ensayadas sobre la proliferación celular.

- Combinación de PM01183 con daunorrubicina. La combinación de PM01183 con daunorrubicina en la línea celular JURKAT (Figura 41) fue aditiva o sinérgica (IC < 1) a determinadas concentraciones de los compuestos.

60 **EJEMPLO 15.** Estudios *in vitro* para determinar el efecto de PM01183 en combinación con agentes quimioterapéuticos sobre líneas celulares de linfoma humano.

Se evaluó el siguiente agente en combinación con PM01183: daunorrubicina (soluciones madre de este compuesto preparadas en DMSO puro y conservadas a -20 °C). Se prepararon diluciones en serie adicionales en medio de

cultivo exento de suero, consiguiendo una concentración final 4x. Se añadieron alícuotas de 50 µl de cada compuesto diluido por pocillo.

5 La línea RAMOS fue la línea celular de linfoma humano seleccionada para este ensayo, que se obtuvo en la American Type Culture Collection (ATCC). Se hicieron crecer células RAMOS en medio RPMI exento de rojo fenol complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina a 37 °C, CO₂ al 5 % y humedad al 95 %.

10 El cribado se efectuó en dos partes, como se describe anteriormente en el ejemplo 14.

En el primer conjunto de ensayos, los valores de CE₅₀ individuales para cada fármaco se determinaron como se muestra en las tablas 15 y 16.

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

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Daunorrubicina	3,15 x 10 ⁻⁷
PM01183	1,39 x 10 ⁻⁹

Tabla 16: Valores de CE₅₀ en concentración molar (M) de cada uno de los agentes para la línea celular tumoral U-937.

Compuesto	CE ₅₀ (M)
Daunorrubicina	3,04 x 10 ⁻⁷
PM01183	1,03 x 10 ⁻⁹

20 En el segundo conjunto de ensayos, se efectuaron curvas de concentración y respuesta para los agentes ensayados, tanto solos como en combinación de dos fármacos. Los efectos de las combinaciones farmacológicas se evaluaron usando el procedimiento de Chou y Talalay como se describe en el ejemplo 14.

25 En las Figuras 42-43 se muestra el efecto de las combinaciones farmacológicas ensayadas sobre la proliferación celular:

- Combinación de PM01183 con daunorrubicina. Las combinaciones de PM01183 con daunorrubicina en las líneas celulares RAMOS (Figura 42) y U-937 (Figura 43), fueron como mínimo aditivas produciendo algunos efectos sinérgicos (IC<1).

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación sinérgica con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico anticanceroso, donde el antibiótico anticanceroso se selecciona de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.
- 10 2. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el aumento de la eficacia terapéutica de un antibiótico anticanceroso en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación sinérgica con dicho antibiótico anticanceroso, donde el antibiótico anticanceroso se selecciona de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.
- 15 3. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antibiótico anticanceroso, forman parte del mismo medicamento.
- 20 4. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antibiótico anticanceroso se proporcionan como medicamentos separados para administración en el mismo momento o en momentos diferentes.
- 25 5. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 4, donde PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el antibiótico anticanceroso se proporcionan como medicamentos separados para administración en momentos diferentes.
- 30 6. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquier reivindicación precedente, donde el antibiótico anticanceroso se selecciona de daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C y actinomicina D.
- 35 7. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquier reivindicación precedente, donde el antibiótico anticanceroso es doxorubicina.
- 40 8. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según cualquier reivindicación precedente, donde el cáncer a tratar se selecciona de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, carcinoma de vejiga, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, cáncer de tiroides, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer esofágico, neuroblastoma, cáncer de cerebro, cáncer cervicouterino, cáncer anal, cáncer testicular, leucemia, mieloma múltiple y linfoma.
- 45 9. PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso según la reivindicación 8, donde el cáncer a tratar se selecciona de cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma maligno, cáncer de próstata, carcinoma de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de ovario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, leucemia y linfoma.
- 50 10. Un kit para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende una forma de dosificación de PM01183, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una forma de dosificación de un antibiótico anticanceroso, e instrucciones para el uso de ambos fármacos en combinación sinérgica como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que el antibiótico anticanceroso se selecciona de daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina, mitomicina C y actinomicina D.

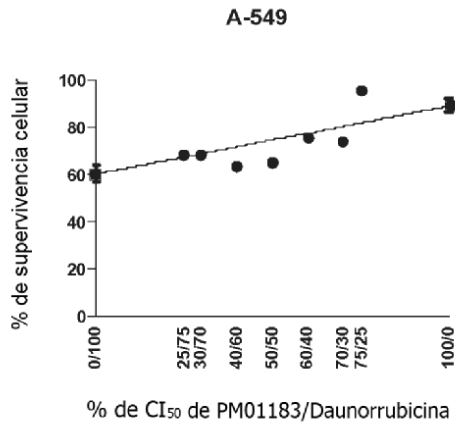


Figura 1

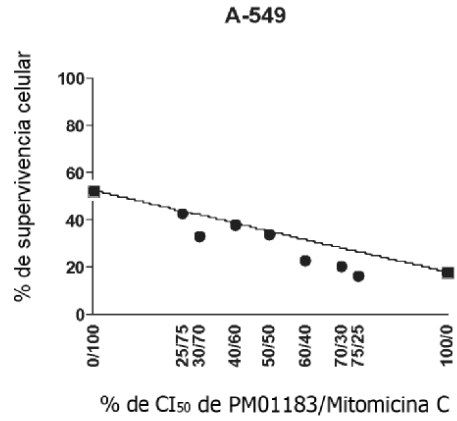


Figura 2

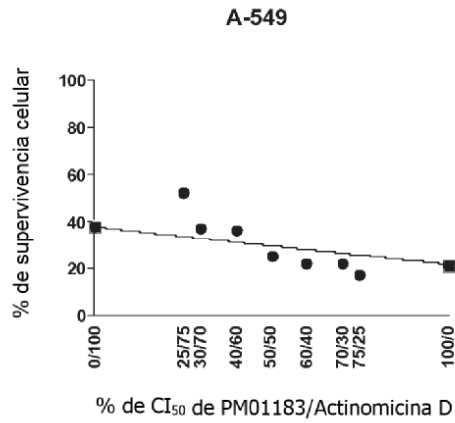


Figura 3

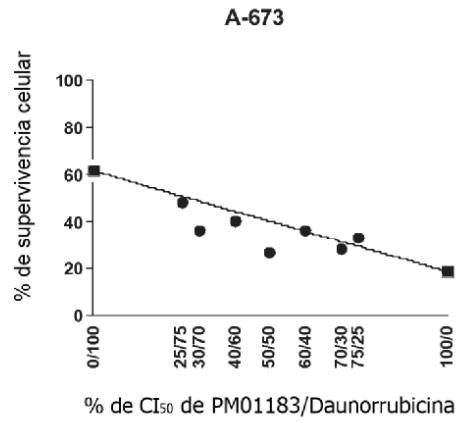


Figura 4

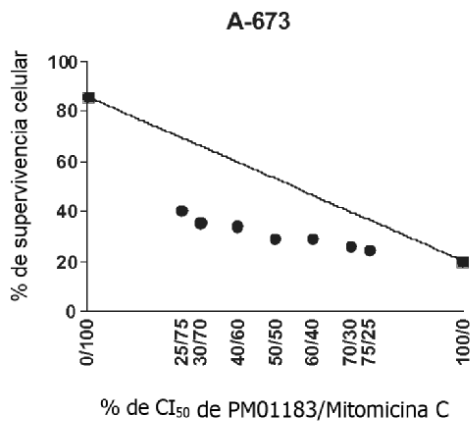


Figura 5

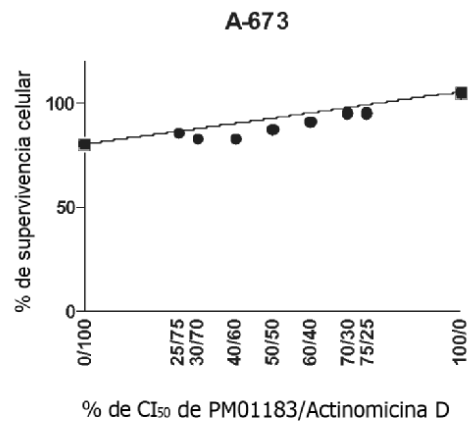


Figura 6

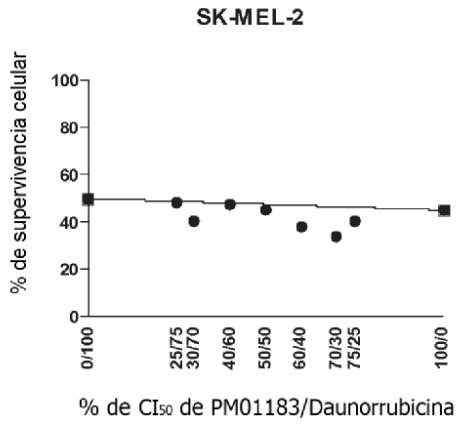


Figura 7

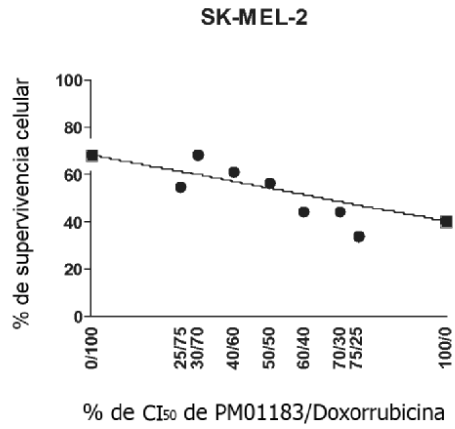


Figura 8

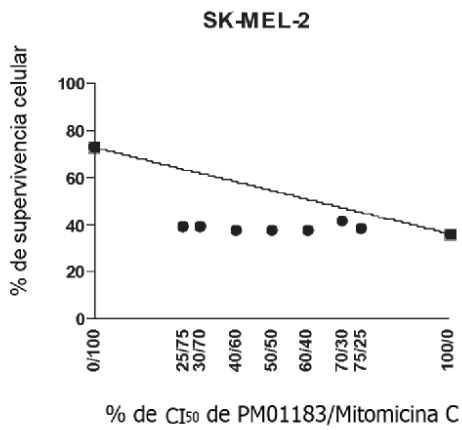


Figura 9

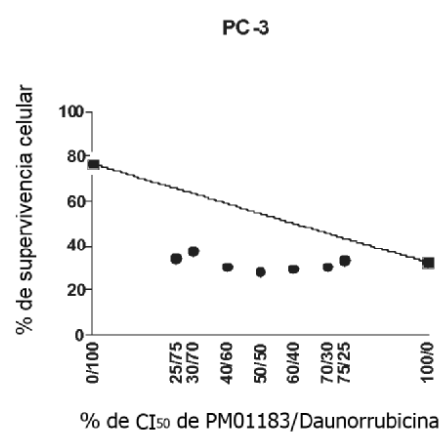


Figura 10

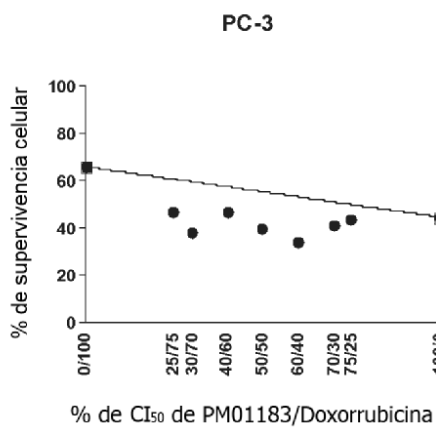


Figura 11

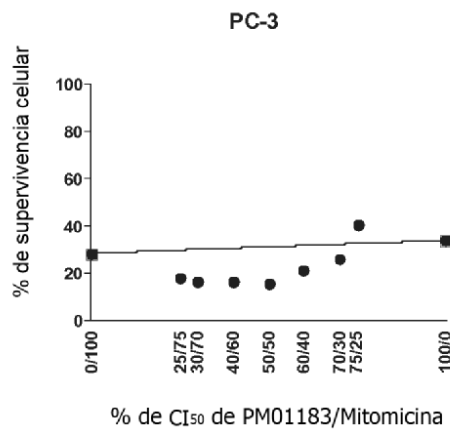


Figura 12

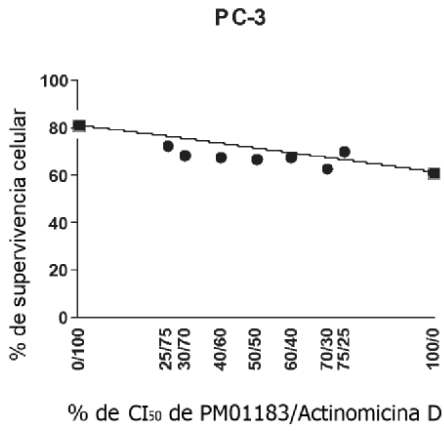


Figura 13

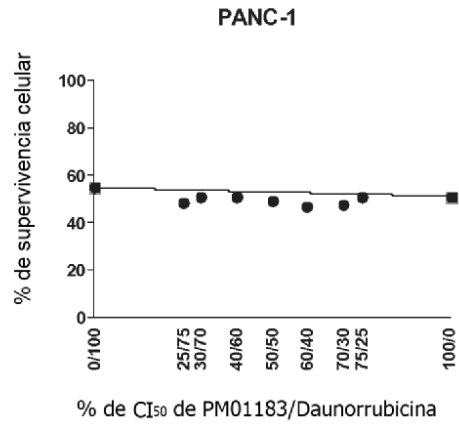


Figura 14

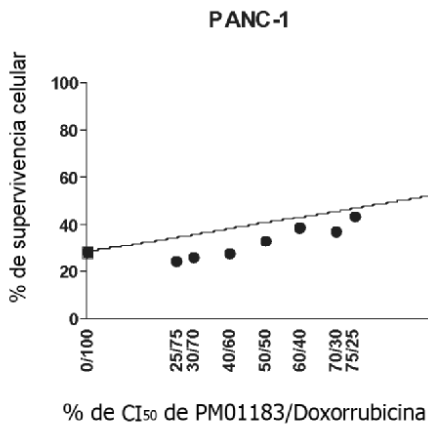


Figura 15

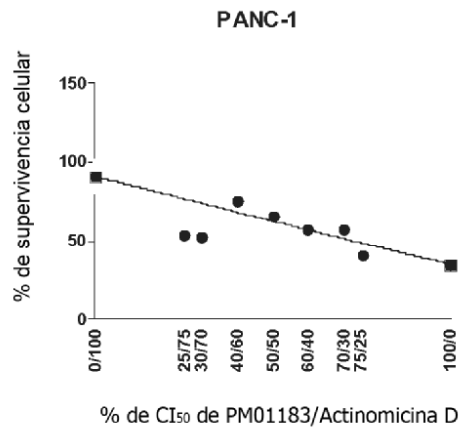


Figura 16

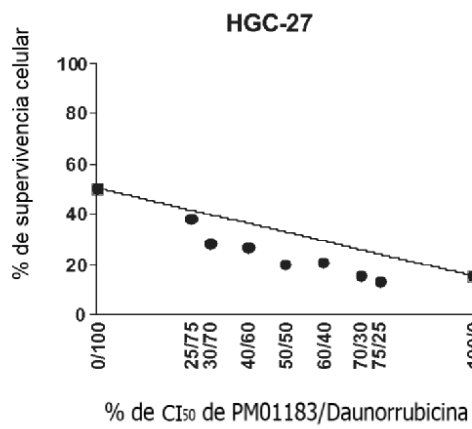


Figura 17

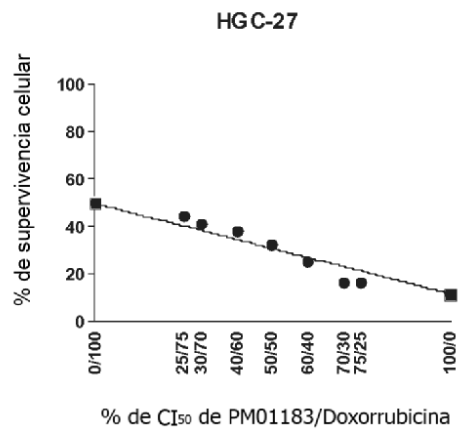


Figura 18

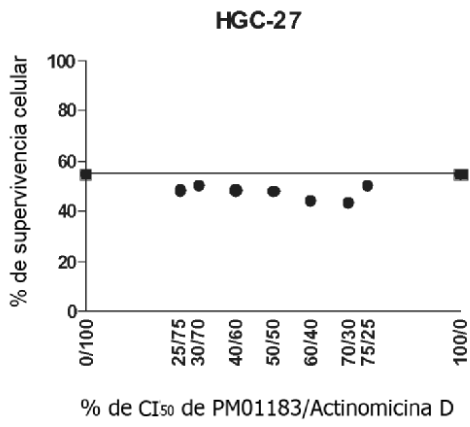


Figura 19

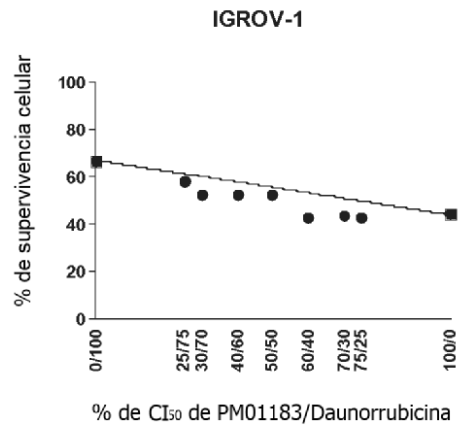


Figura 20

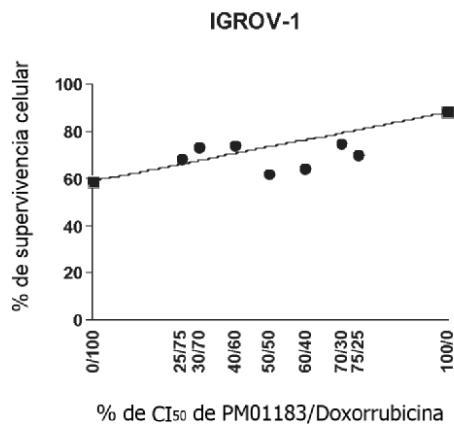


Figura 21

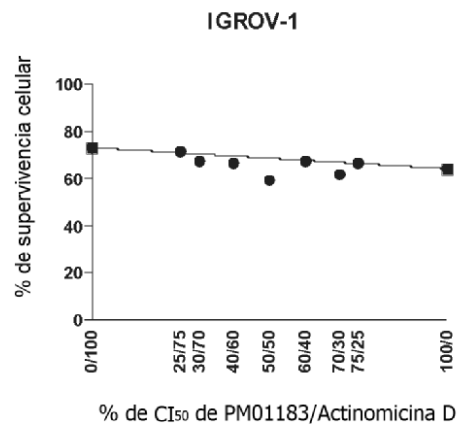


Figura 22

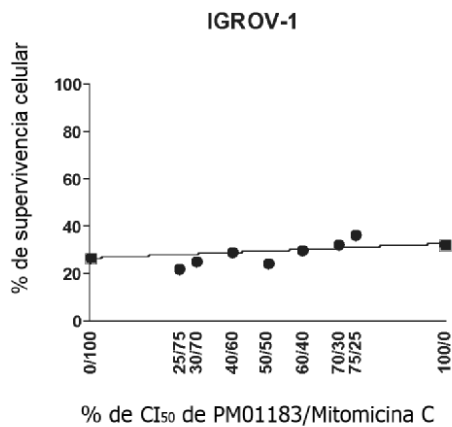


Figura 23

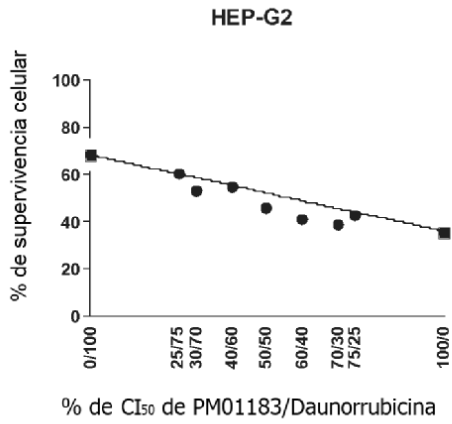


Figura 24

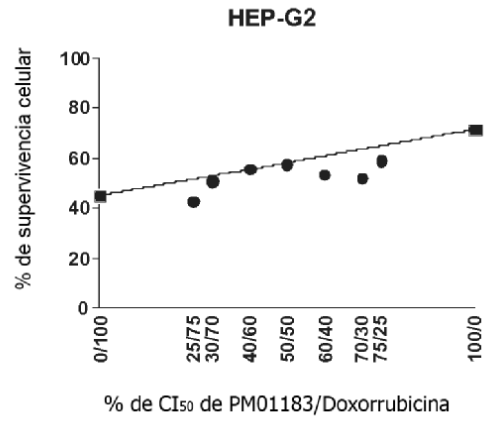


Figura 25

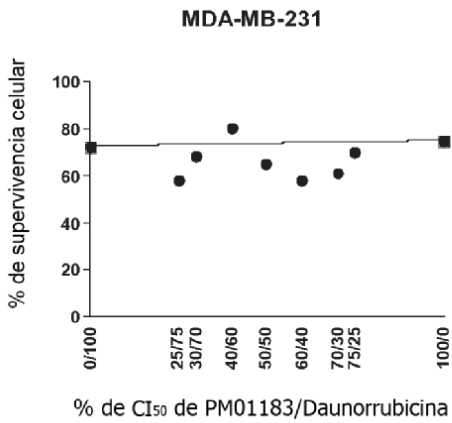


Figura 26

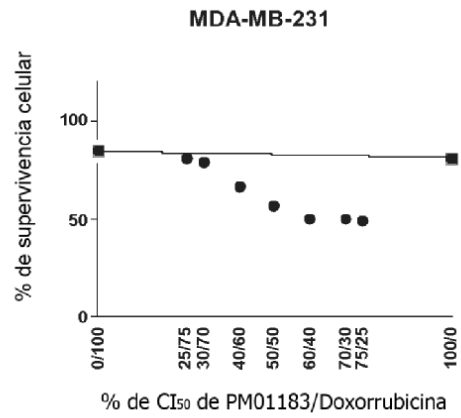


Figura 27

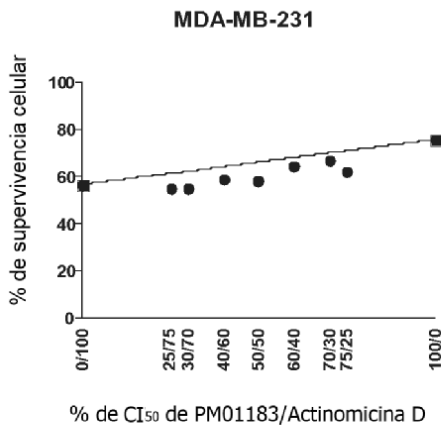


Figura 28

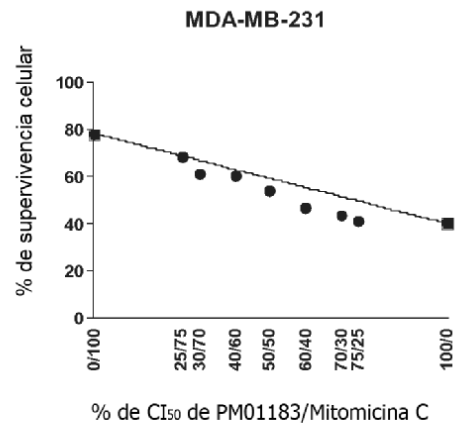


Figura 29

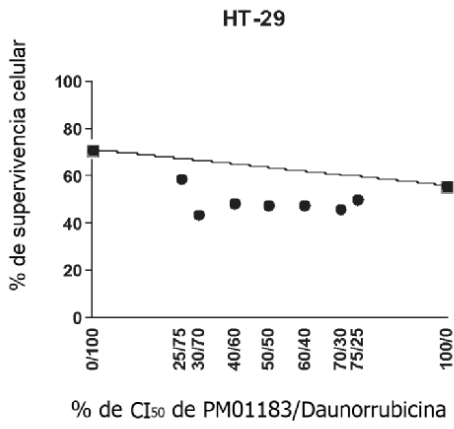


Figura 30

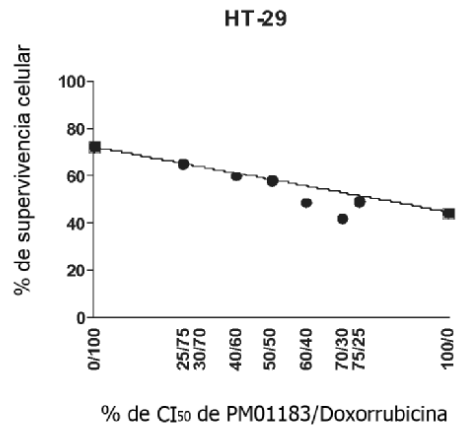


Figura 31

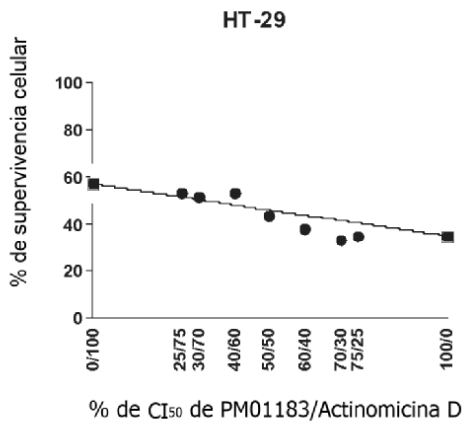


Figura 32

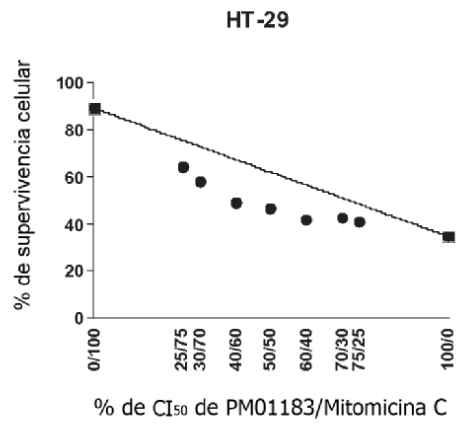


Figura 33

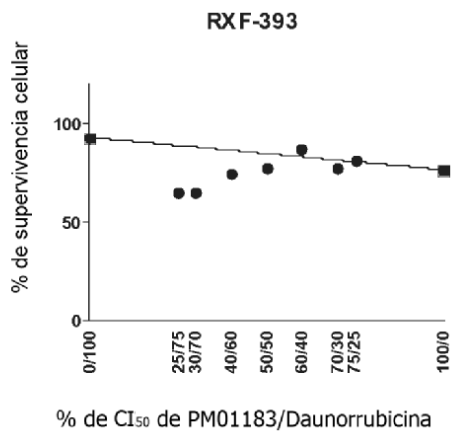


Figura 34

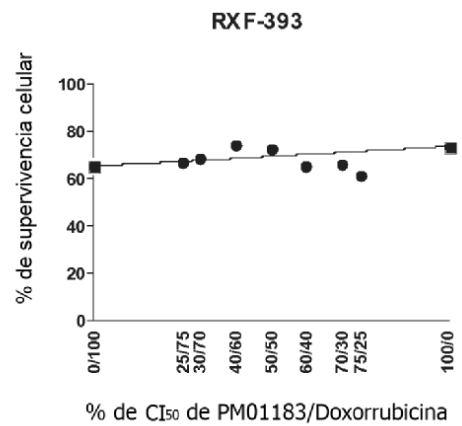


Figura 35

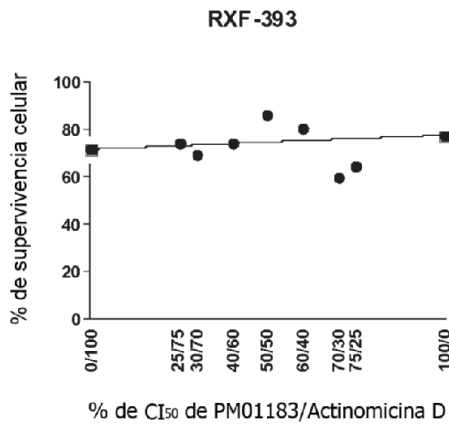


Figura 36

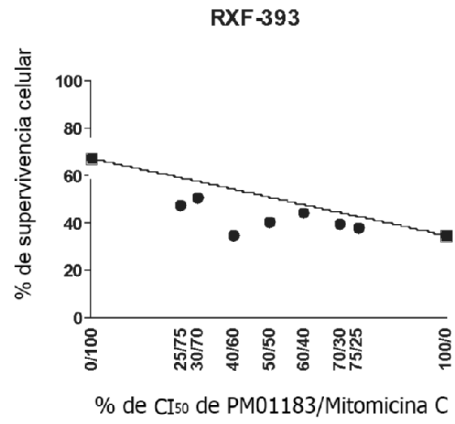


Figura 37

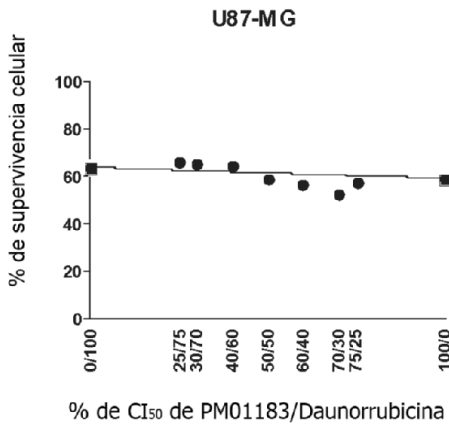


Figura 38

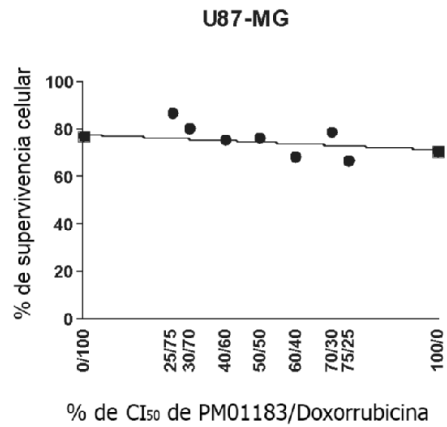


Figura 39

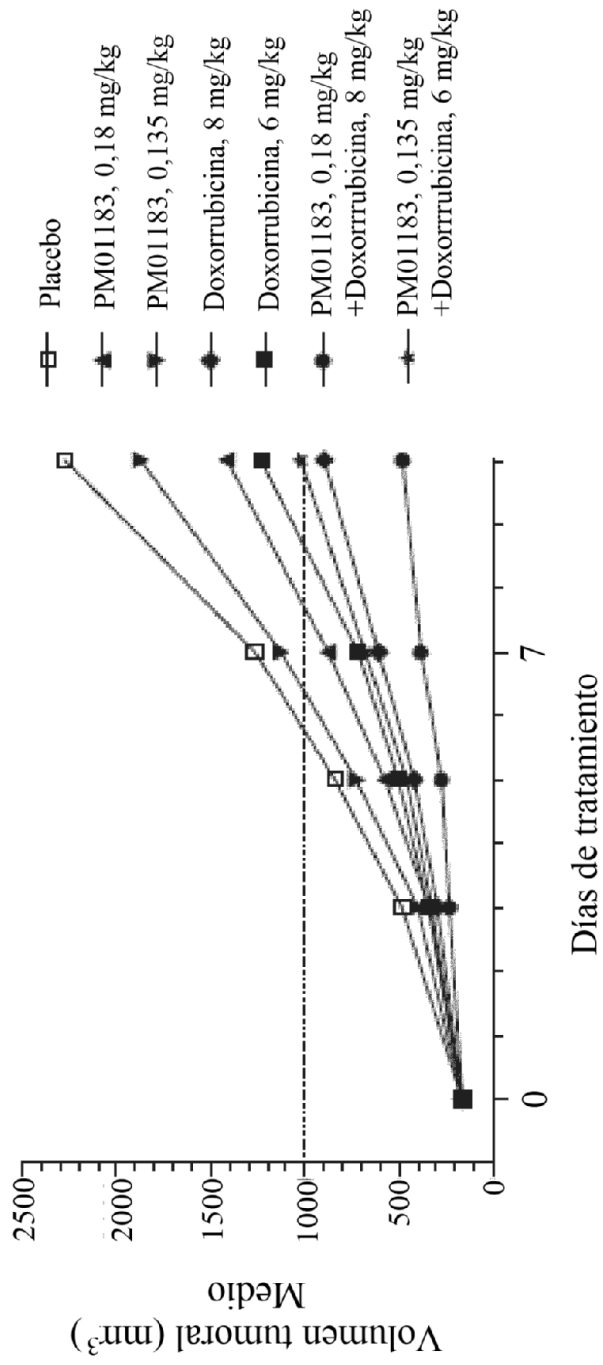


Figura 40

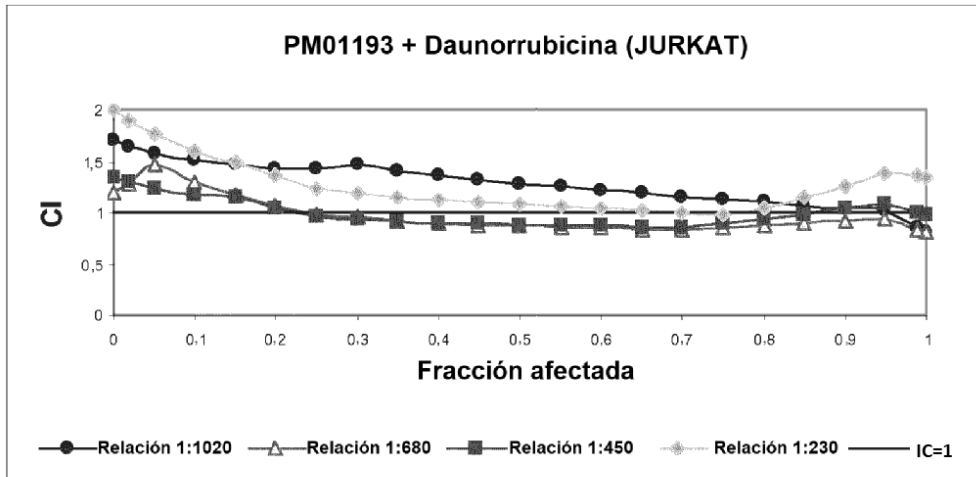


Figura 41

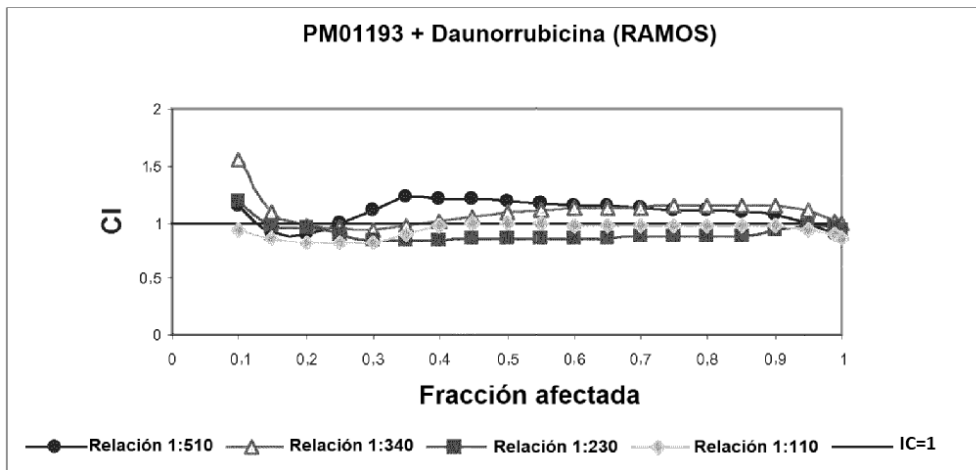


Figura 42

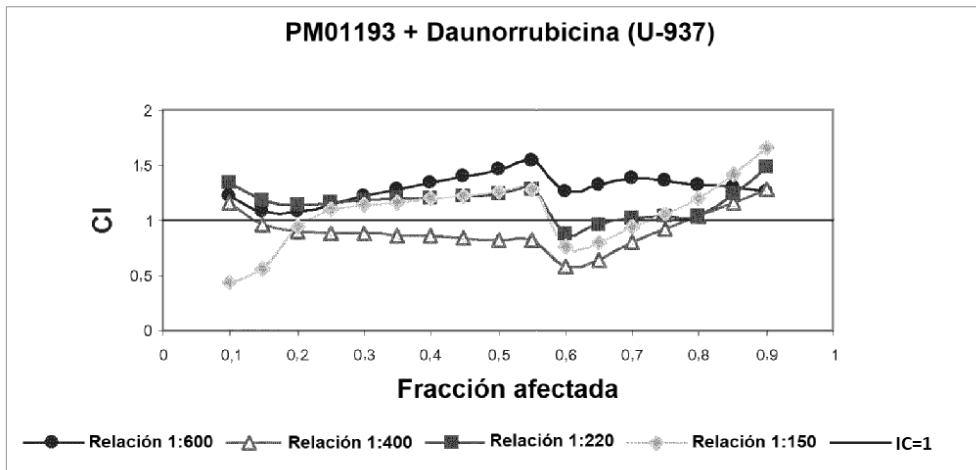


Figura 43