



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 085**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/375** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01964398 .0**

96 Fecha de presentación : **24.08.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1286674**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2003**

54 Título: **Composición para potenciar agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.**

30 Prioridad: **01.09.2000 US 654377**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2008**

73 Titular/es: **The Ester C Company**  
**6735 Inter-Cal Way**  
**Prescott Arizona 86301, US**

72 Inventor/es: **Jariwalla, Raxit, J.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 309 085 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**

Composición para potenciar agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.

5 La presente solicitud es una continuación en parte y reivindica la prioridad convencional que se basa en la solicitud de patente US, en trámite, número de serie 09/654.377, registrada el 1 de septiembre del 2000 del mismo solicitante.

**Antecedentes de la invención**

10 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para potenciar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos del cáncer.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a los procedimientos y composiciones que permiten aumentar la efectividad de los agentes quimioterapéuticos del cáncer, de modo que dichos agentes puedan utilizarse a dosis más bajas, sin sacrificar la eficacia del agente.

20 Todavía en otro aspecto, la invención se refiere a composiciones quimioterapéuticas contra el cáncer que incluyen una combinación de componentes quimioterapéuticos que provocan la apoptosis de las células cancerosas o una reducción en su proliferación, o ambas.

25 Se conocen numerosos agentes quimioterapéuticos del cáncer. En muchos casos, sin embargo, la administración de dichos agentes a dosis efectivas puede causar efectos secundarios indeseables que limitan severamente su utilidad. De acuerdo con esto, sería muy deseable que se proporcionaran procedimientos y composiciones que potenciaran los efectos quimioterapéuticos de dichos agentes, de forma que pudieran administrarse a dosis más bajas, reduciendo por tanto o eliminando dichos efectos secundarios no deseados. Alternativamente, dichos procedimientos y composiciones posibilitarían obtener efectos quimioterapéuticos mayores a partir de la administración de una dosis dada de un agente quimioterapéutico, sin que los efectos secundarios aumentarían.

**Breve descripción de las figuras**

30 En las figuras:

la Fig. 1 muestra el efecto de una furanona (FR) representativa derivada de la vitamina C sobre las células hepáticas normales y después de tres aplicaciones del tratamiento con ella;

35 la Fig. 2 muestra el efecto de la furanona sobre las células humanas del hepatoma;

40 la Fig. 3 muestra la actividad mortal celular de la furanona (Preparación nº 1), en células de melanoma humano y en fibroblastos dérmicos normales;

la Fig. 4 la actividad inductora de muerte celular de la furanona (Preparación nº 2) en células de melanoma humano y en fibroblastos dérmicos normales;

45 la Fig. 5 muestra el efecto sobre el hepatoma de una dosis única de adriamicina (ADR), de ADR más 5 mM de ácido ascórbico (AA), de ADR más ascorbato cálcico (CA) a 5 mM equivalentes AA, después de una y dos aplicaciones;

la Fig. 6 muestra una supresión similar del hepatoma con ADR más Éster C (0,5 mM equivalentes AA);

50 la Fig. 7 muestra la influencia de ADR con dos distintas concentraciones de la triple mezcla (CA+CT+FR), después de una aplicación de ADR y tres aplicaciones de la mezcla;

la Fig. 8 muestra los efectos relativos de CA, EC y CA+CT+FR sobre la actividad ADR.

55 Las Figuras 9 y 10 muestran los efectos de la triple mezcla (CA+CT+FR) a varias dosis de ADR contra células de melanoma humano en dos ensayos distintos;

60 Las Figuras 11 y 12 muestran los efectos sobre las células del melanoma y del hepatoma, respectivamente, después de dos tratamientos secuenciales con combinaciones que contenían distintas proporciones de treonato a ascorbato, efectos medidos por el inmunoensayo de proliferación celular basado en BudR.

Las Figuras 13 y 14 comparan la sensibilidad del melanoma y del hepatoma, respectivamente, después de tres tratamientos con mezclas que contenían varias proporciones de furanona a ascorbato, sensibilidad medida mediante el ELISA de proliferación celular basado en BudR.

65 Las figuras 15 y 16 muestran el efecto sobre el melanoma y el hepatoma, respectivamente, de mezclas triples que contenían concentraciones crecientes (del 1% al 7,5%) de furanona, en el ensayo anterior.

## ES 2 309 085 T3

La Figura 16A muestra el efecto sobre las células del hígado normal y las del hepatoma de la triple mezcla CA(92,5%)/CT(7,5 %)/FR(7,5%) que contenía equivalentes de ácido ascórbico similares a los de la mezcla doble (CA+CT);

5 la Fig. 17 muestra el efecto de la furanona sola sobre la proliferación de la progenie celular del hepatoma (SK-Hep-1);

la Fig. 18 muestra el efecto de la furanona sobre la proliferación de las células del hepatoma expuestas a varias concentraciones de ADR;

10 la Fig. 19 muestra los efectos de la furanona sola, de CA+CT+FR y del Éster C (EC) sobre la proliferación de las células del hepatoma;

la Fig. 20 muestra la actividad comparativa sobre la proliferación de las células del hepatoma de la furanona, de CA+CT+FR y de EC en combinación con ADR;

15 la Fig. 21 muestra los efectos sobre la proliferación de las células del melanoma de la furanona, de CA+CT+FR y de EC en combinación con ADR, a todas las concentraciones de ADR.

### 20 **Breve descripción de la invención**

Se ha descubierto actualmente que el efecto quimioterapéutico de los agentes quimioterapéuticos del cáncer (reducción en la tasa de proliferación de las células cancerosas y/o apoptosis de las células cancerosas) se potencia significativamente combinándolos con un componente potenciador que es el 4-hidroxi-5-metil-3(2H) furanona.

25 Mediante esta técnica, se alcanza un efecto quimioterapéutico idéntico del cáncer con dosis significativamente más bajas, en algunos casos, con dosis que son sólo la décima parte de las requeridas si se administra solo el agente quimioterapéutico. Además, se ha descubierto que dichas furanonas potencian los efectos citotóxicos tumorales y/o antiproliferativos de los ascorbatos minerales y de las mezclas de ascorbatos minerales y otros metabolitos de la vitamina C.

En la forma de realización actualmente preferida de la invención, se utiliza una 4-hidroxi-5-metil-3(2H) furanona como componente potenciador, en combinación con otro agente quimioterapéutico del cáncer, para obtener una composición que presente una capacidad quimioterapéutica superior a la de la furanona o la del otro agente quimioterapéutico por separado. A su vez, esto permite la utilización de una dosis más baja del otro agente quimioterapéutico para obtener los mismos efectos quimioterapéuticos selectivos que se obtendrían si el agente quimioterapéutico se utilizara solo, pero a una dosis más alta.

### 40 **Descripción detallada de la invención**

El componente furanona de las composiciones de la presente invención puede sintetizarse mediante cualquier técnica apropiada. Alternativamente, se puede utilizar una mezcla de la furanona y de los ascorbatos minerales solubles plasmáticos que se encuentra disponible comercialmente con la marca registrada "Ester C" de la Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona, USA.

45 Según la presente invención, se proporciona una composición quimioterapéutica contra el cáncer que comprende doxorubicina y 4-hidroxi-5-metil-3(2H)furanona.

Los procedimientos de la presente invención comprenden la administración de una dosis quimioterapéutica para tratar el cáncer, como dosis única o en dosis repetidas, de las composiciones quimioterapéuticas contra el cáncer potenciadas tal como se ha descrito anteriormente. La administración puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica apropiada que se utilice normalmente para administrar los agentes quimioterapéuticos del cáncer, por ejemplo, oralmente o mediante inyección parenteral.

### 55 **Ejemplos ilustrativos**

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la práctica de la invención y las formas de realización suyas que son actualmente preferidas.

#### 60 **Ejemplo 1**

Este ejemplo muestra el potencial citotóxico, de muerte celular, de una furanona representativa, 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona, un metabolito de la vitamina C, contra varios tipos celulares normales y derivados de tumores humanos.

65 Se evaluaron cuatro tipos celulares tumorales humanos, que se mostraron previamente sensibles a combinaciones del ascorbato mineral más metabolitos. Estas progenies consisten en: (i) un hepatoma (SK-Hep-1), (ii) un melanoma

## ES 2 309 085 T3

5 maligno (Malme-3M), (iii) un neuroblastoma (SK-N-MC) y (iv) un carcinoma de colon (T84). Los tipos celulares no malignos consisten en hepatocitos humanos normales (WRL 68), fibroblastos dérmicos normales (Malme-3) y células epiteliales retinales normales (ARPE-19). Las progenies derivadas de tumores, los hepatocitos normales y los fibroblastos dérmicos se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). La progenie celular ARPE-19 es una donación de un colega en el California Institute for Medical Research. Las células se desarrollaron y mantuvieron en cultivo en un incubador humidificado con un 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire.

10 Por la Inter-Cal Corporation (Prescott, Arizona), se proporcionaron unas muestras de 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona, un producto de síntesis altamente purificado, en dos lotes (Preparaciones 1 y 2) del producto congelado. Las muestras se congelaron y guardaron inmediatamente después de su recepción y cuando no se utilizaban. Se prepararon reservas maestras (1% peso/volumen) de la furanona en agua estéril, conservándose congeladas el tiempo que durara cada experimento. En el día del tratamiento, las reservas maestras se diluyeron serialmente en agua estéril para obtener reservas de trabajo con una fuerza 10X.

15 Procedentes de cultivos (1-2) adherentes antiguos, se expusieron monocapas subconfluentes (que se sembraron con una densidad de 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos), a un volumen 0,1 de diluciones seriadas (soluciones concentradas 10X) de la furanona, retornando entonces la placa al incubador. El tratamiento con la furanona (segunda aplicación), se repitió después de 48 horas añadiendo directamente la respectiva solución 10X sin cambiar el medio de cultivo. Después de otra incubación durante 48 horas, se reemplazó el medio de cultivo con otro medio de cultivo recién preparado, seguido por una tercera aplicación de la concentración correspondiente de furanona. Los pocillos de control recibieron un volumen idéntico de agua estéril (en lugar de la solución de furanona), manejándose de forma idéntica. Después de la incubación final de 48 horas, (después del tercer tratamiento), se prepararon lisados celulares extrayendo la monocapa con 0,2 ml de solución de lisis, seguido por centrifugación a baja velocidad (2.500 rpm, 10 minutos). Se recogió el sobrenadante (lisado citoplásmico) y una parte alícuota de 20 microlitros se ensayó en cuanto a la presencia de complejos ADN-histona (fragmentos nucleosómicos), mediante detección fotométrica (absorbancia a 405-410 nm) utilizando el ensayo Elisa de detección de la muerte celular (Roche Diagnostics).

20 Los efectos de la furanona sobre el hígado humano normal y las células del hepatoma después de tres tratamientos secuenciales, se muestran en las Figuras 1 y 2. En el intervalo de concentración evaluado (0,01-0,0001%), el compuesto produce un cambio máximo en la tasa de mortalidad celular inferior a 0,3 logs en las células hepáticas normales (Fig. 1). Contrariamente a esto, en las células del hepatoma tratadas con concentraciones de furanona del orden de 0,001-0,01% (Fig. 2), que corresponden a un intervalo de molaridad del 0,08 al 0,88 mM de furanona, se apreciaron incrementos muy marcados de la muerte celular en las células del hepatoma. Este efecto en las células del hepatoma disminuye con concentraciones crecientes de furanona que se acercan al 0,1%, debido posiblemente a la pérdida celular que tiene lugar a partir del cambio en el pH del medio de cultivo con la dosis más alta (0,1% de furanona, datos que no se muestran).

25 Las Figuras 3 y 4 muestran los efectos de dos preparaciones distintas de la furanona sobre el melanoma maligno (Malme-3M) y su homólogo celular normal, los fibroblastos dérmicos humanos (Malme-3). Una especificidad inductora de la muerte celular similar a la observada en las células del hepatoma, se observó en el melanoma maligno. De este modo, ambas preparaciones de furanona indujeron una muerte dependiente de la dosis de la progenie del melanoma (un incremento de 5 a 10 veces en la apoptosis) con respecto a un efecto irrelevante sobre los fibroblastos dérmicos normales (aumento < 0,3 log en apoptosis). La concentración mínima que se requirió para producir un doble cambio en la tasa de la apoptosis es ligeramente más alta para las células del melanoma (0,003% de furanona) que para las células del hepatoma (<0,001% de furanona).

30 Al contrario que los efectos sobre los tipos celulares del hepatoma y del melanoma, el tratamiento con furanona de las células del carcinoma de colon produce un cambio <0,5 log en la tasa de apoptosis celular (con respecto al del control no tratado), cuando se evaluó en una intervalo comparable de concentración (hasta un máximo de 0,01% de furanona). A intervalos de concentración más bajos (hasta un máximo de 0,003% en ARPE-19 y 0,001% en SK-N-MC), el tratamiento con furanona no provocó cambios significativos en las tasas de mortalidad de las células epiteliales normales y de las del neuroblastoma.

35 De este modo, el tratamiento de las progenies celulares del melanoma y del hepatoma humano maligno y del no maligno mediante la 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona, un metabolito de la vitamina C, muestra una citotoxicidad preferente del compuesto con respecto a las células malignas, tal como se indica por la inducción tumoral específica de la muerte celular.

### 60 Ejemplo 2

Los procedimientos siguientes se llevaron a cabo para ilustrar la actividad de las composiciones ascorbato cálcico (CA), ascorbato cálcico-treonato cálcico (CA + CT), composiciones ascorbato cálcico-treonato-furanona (CA+ CT+ FR), y una composición ascorbato cálcico-metabolitos-furanona (EC) disponible comercialmente con la marca Ester-C® de Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona, USA, solas y en combinación con un típico agente quimioterapéutico del cáncer, la adriamicina (doxorubicina).

## ES 2 309 085 T3

El ascorbato cálcico (CA), el treonato de calcio (CT), la 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (FR) y el Ester-C (EC) se obtuvieron de Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona USA. El ácido ascórbico (AA) de grado cultivo tisular se obtuvo de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. La composición del ascorbato cálcico (calcio dl-(L-ascorbato) dihidrato) se preparó disolviendo secuencialmente la sal en agua estéril para obtener soluciones maestras de reserva de idéntica fuerza (1% peso/vol). La solución acuosa de ascorbato cálcico más el treonato cálcico más la 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (CA/CT/FR) se preparó con unas proporciones de 85/7,5/7,5. Para el análisis comparativo, se utilizaron las soluciones de reserva que contenían los mismos equivalentes de ácido ascórbico (AA). Todas las reservas maestras se guardaron a temperatura ambiente durante la realización de estos procedimientos. De éstos, se prepararon reservas de trabajo 10X mediante dilución en serie en el día en que se fueron a utilizar, y se aplicaron a las células en placas de microtitulación tal como se describe a continuación.

La adriamicina (doxorubicina) se obtuvo de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Las soluciones de reserva se prepararon disolviendo adriamicina (ADR) en agua estéril y DTIC en agua o en solución diluida de ácido acético (0,01 N). Las reservas de guardaron congeladas a -10°C, descongelándose antes de utilizarlas. Se realizaron diluciones seriadas en agua estéril para obtener soluciones con una fuerza de 10X, aplicándose a las células en el tratamiento una décima parte del volumen de éstas.

Las progenies derivadas de tumores humanos diana están formadas por SK-Hep-1, un adenocarcinoma hepático (hepatoma), y Malme-3M, un melanoma maligno. Todos los cultivos de siembra se obtuvieron de ATCC, Manassas, VA, USA, y se propagaron/mantuvieron en medio de crecimiento que contenía suero, en un incubador humidificado de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Las células SK-Hep-1 se desarrollaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) en sales de Earle más aminoácidos no esenciales suplementados con FBS al 10% más antibióticos, y las células Maime-3M se cultivaron en medio de McCoy suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15% más antibióticos.

Para el tratamiento, células que crecían exponencialmente se sembraron con una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo de placas de microtitulación con 96 pocillos en 0,1-0,2 ml del medio de crecimiento. Después del acoplamiento celular durante la noche, a 37°C, los pocillos duplicados se expusieron a varios tratamientos mediante aplicación directa de la décima parte de un volumen de una solución de fuerza 10X. Para los tratamientos que implican al agente quimioterapéutico, se aplicó a los pocillos la décima parte de un volumen de diluciones seriadas de adriamicina (0,0006-3,0 micromoles), seguido de la aplicación de una composición conteniendo ascorbato (adyuvante) o agua estéril (control). El tratamiento con el adyuvante se repitió cada día o en el tercer día (según correspondiera) sin cambiar el medio de crecimiento. Los controles no tratados recibieron una cantidad equivalente de agua estéril. Después de 2-3 tratamientos con el adyuvante, las células se marcaron con BudR tal como se describe a continuación. (En algunos experimentos, se volvió a proporcionar a los pocillos un volumen idéntico de medio de crecimiento, antes de añadir BudR. Esto proporcionó una mayor incorporación de BudR al ADN con respecto a la no refluidificación).

Para el marcaje del ADN, se adaptó el procedimiento que se menciona seguidamente, modificándolo a partir del ensayo ELISA de proliferación celular, (procedimiento que consiste) en el ensayo colorimétrico de BudR de Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA: cada pocillo tratado se expuso a la décima parte del volumen de un medio 10X que contenía BudR, volviéndose a incubar a 37°C durante la noche (15-20 horas). Un conjunto de pocillos de control se expuso solo al medio (sin BudR) para obtener un blanco de control de la absorbancia (sólo el sustrato) para el ensayo. Después del período de marcado, se eliminó el medio de cultivo, fijándose las células y desnaturalizándose el ADN en una etapa, añadiendo FixDenat (30 min en RT). Entonces, FixDenat se eliminó, añadiéndose el reactivo anti-BudR-peroxidasa y continuando la incubación 90 minutos en RT. Después de eliminar este último, se lavó la placa 3 veces, seguido por la adición de la solución del sustrato. Se mantuvo la placa en RT hasta que el desarrollo del color fue suficiente para la detección fotométrica (5-10 min). En este momento, se detuvo la reacción añadiendo a cada pocillo 25 microlitros de ácido sulfúrico 1M, seguido por su mezcla durante aproximadamente 1 minuto en el agitador. La absorbancia de las mezclas se midió en un lector ELISA a 450 nm, a los 5 minutos después de añadir la solución de detención. La OD<sub>450 nm</sub> constituye una medida del nivel de la incorporación de BudR al ADN, que es proporcional a la tasa de proliferación celular. Para el análisis de datos, el promedio de la absorbancia se graficó con respecto a la concentración del medicamento quimioterapéutico para cada tratamiento, para obtener una relación dosis-respuesta del efecto antiproliferativo.

### *Influencia del Ascorbato, del Éster-C y de la Combinación de Triple Ascorbato más Metabolitos sobre la Actividad Antineoplásica de la Adriamicina contra las Células del Hepatoma*

La Figura 5 muestra los efectos de una dosis de sólo Adriamicina (ADR), de ADR más 0,5 mM de ácido ascórbico y de ADR más ascorbato cálcico (0,5 mM equivalentes AA) después de una aplicación de ADR y de dos aplicaciones del adyuvante (AA o CA). Téngase en cuenta que el tratamiento combinado con el adyuvante (AA o CA) da lugar a una supresión mayor de la proliferación del hepatoma que la ADR sola. El efecto potenciador es importante con dosis bajas a moderadas de ADR (0,003-0,03 micromoles), comparado con una dosis más alta de ADR (0,3 micromoles). El ascorbato cálcico es más efectivo que el ácido ascórbico. Se apreció un tipo similar de supresión del hepatoma con ADR más Éster-C (que contiene 0,5 mM de equivalentes AA) en el mismo ensayo.

En otro procedimiento, los efectos de una triple combinación de metabolitos del ascorbato (CA + CT + FR), en proporciones de (85:7,5:7,5) sobre la actividad ADR, se evaluaron paralelamente a los de CA o EC. La Fig. 7 muestra la influencia de 2 concentraciones distintas (0,015% y 0,033%) de la triple mezcla, después de una aplicación de

## ES 2 309 085 T3

ADR y de tres aplicaciones de la mezcla. Como puede apreciarse en el gráfico, tuvo lugar una proliferación mayor de las células del hepatoma después de ADR + de la combinación triple que con la ADR sola. Una vez más, el efecto potenciador es más importante con dosis bajas o moderadas (0,0017-0,017 micromoles) de ADR que con las dosis más altas (0,17 micromoles) de la ADR ensayada.

La Fig. 8 muestra los efectos relativos del 0,033% de CA, EC y CA + CT + FR sobre la actividad de ADR en el mismo experimento. Las tres composiciones que contenían ascorbato mejoraron de forma consistente la actividad antiproliferativa de dosis bajas de ADR, dando lugar, con EC y la triple mezcla de ascorbato más metabolitos, a una mejoría mayor que CA. Muy notablemente, cuando se utilizaron EC y CA+CT+FR combinados con 0,017 micromoles de ADR, se produjo un efecto antineoplásico idéntico o ligeramente mejor que cuando se comparó con una dosis 10 veces superior (0,17 micromoles) de ADR sola.

### *Efecto de la Composición de Triple Ascorbato más Metabolitos sobre la Actividad Proliferativa de la Adriamicina en las Células del Melanoma*

Las Figuras 9 y 10 muestran los efectos de la triple mezcla (CA+CT+FR, con 0,033%) más varias dosis de ADR, contra las células del melanoma humano, (observados) a partir de dos ensayos distintos. En ambos ensayos, la triple mezcla potencia la actividad antineoplásica de la ADR, preferentemente con dosis bajas a moderadas del medicamento quimioterapéutico.

De este modo, las composiciones que contienen ascorbato mejoran la actividad antineoplásica de los agentes quimioterapéuticos del cáncer (adriamicina) tanto contra las progenies celulares derivadas del hepatoma como del melanoma, tal como se evaluó utilizando un inmunoensayo de proliferación celular. El efecto potenciador es más destacado con dosis bajas o moderadas del medicamento quimioterapéutico. Las composiciones que contienen el ascorbato más los metabolitos son más efectivas para potenciar la actividad de la adriamicina que (las que contienen) sólo el ascorbato. Cuando se combinan las mezclas triples que contienen ascorbato cálcico, treonato cálcico y furanona (en proporciones de 85:7,5:7,5) con dosis bajas de adriamicina, suprimen la proliferación celular tumoral en un nivel similar a o ligeramente mejor que una dosis 10 veces más alta de adriamicina sola. Estos resultados indican que la utilización de ascorbato más metabolitos en combinación con una dosis baja del agente quimioterapéutico, reduce la toxicidad potencial asociada con el medicamento.

### Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la actividad de varias mezclas del ascorbato más metabolitos contra las progenies celulares derivadas de los tumores humanos hepatoma y melanoma, utilizando un inmunoensayo de proliferación celular basado en la incorporación de BudR durante la síntesis del ADN.

Para usarlas en cada experimento, se prepararon recientemente soluciones acuosas de las mezclas siguientes:

Ascorbato cálcico más treonato cálcico (CA/CT) con las proporciones de:

99/1 (mezcla estándar)

97,2/2,5

95/5

92,5/7,5 y

90/10

Ascorbato cálcico más 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (CA/FR), con proporciones de:

99,9/0,1 (mezcla estándar)

99/1

97,2/2,5

95/5 y

92,5/7,5

## ES 2 309 085 T3

Ascorbato cálcico más treonato cálcico más 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (CA/CT/FR), con proporciones de:

91,5/7,5/1

5 90/7,5/2,5

90/7,5/2,5

10 88,5/7,5/15

85/7,5/7,5

90/10/1 y

15 80/10/10

Ascorbato cálcico, treonato cálcico y 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona, que se obtiene de Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona. La composición de ascorbato cálcico (Calcio di-(L-ascorbato) dihidrato) es ácido L-ascórbico (82,15%), calcio (9,45%) y agua (8,44%).

Las mezclas acuosas se prepararon disolviendo secuencialmente componentes individuales en agua estéril para conseguir soluciones máster de reserva de idéntica fuerza (1% peso/volumen) para análisis comparativo. En algunos casos, se prepararon soluciones de reserva con una fuerza del 1,08% para obtener equivalentes comparables de ácido ascórbico entre mezclas combinatorias dobles y triples. Todas las reservas máster se guardaron a temperatura ambiente durante estos experimentos. A partir de estas reservas máster, se prepararon reservas de trabajo con una fuerza de 10X mediante dilución en serie, en el día de su utilización, aplicándose a las células en placas de microtitulación, tal como se describe a continuación. Las mezclas estándar contienen metabolitos constituyentes en proporciones que reflejan las de "Ester-C" ascorbato cálcico, y se obtuvieron de Inter-Cal Corporation, Prescott, Arizona.

Las progenies normales o las derivadas de tumores humanos diana consisten en Malme-3M, un melanoma maligno, SK-Hep-1, un adenocarcinoma hepático (hepatoma), y las células WRL 68, una progenie de células hepáticas normales. Todos los cultivos de siembra se obtuvieron de ATCC, (Manassas, VA), y se propagaron/mantuvieron en medio de crecimiento que contenía suero, en un incubador humidificado de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Las células Maimme-3M se cultivaron en medio de McCoy complementado con suero fetal bovino (FBS) al 15% más antibióticos. y las células SK-Hep-1 y las progenies CL-48 se desarrollaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) en sales de Earle más aminoácidos no esenciales suplementados con FBS al 10% más antibióticos.

El procedimiento siguiente está adaptado y modificado a partir del ensayo ELISA de proliferación celular, BudR (procedimiento que consiste) en el ensayo colorimétrico de Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

Para el tratamiento, células que crecían exponencialmente se sembraron con una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo de placas de microtitulación con 96 pocillos en 0,1-0,2 ml de medio de crecimiento. Después del acoplamiento celular durante la noche, a 37°C, los pocillos duplicados se expusieron a diluciones seriadas de mezclas ascorbato/metabolito aplicando directamente la décima parte de un volumen de una solución de fuerza 10X. El tratamiento se repitió diariamente aplicando la mezcla respectiva ascorbato/metabolito sin cambiar el medio de crecimiento. Los controles no tratados recibieron una cantidad equivalente de agua estéril. Después de 2-3 tratamientos diarios, las células se marcaron con BudR tal como se describe a continuación. (En algunos experimentos, se volvió a proporcionar a los pocillos un volumen idéntico de medio de crecimiento, antes de añadir BudR. Esto proporcionó una cantidad mayor de incorporación del BudR al ADN con respecto a la no refluidificación).

Para el marcaje del ADN, cada pocillo tratado se expuso a una décima parte del volumen del medio 10X que contenía BudR y que se volvió a incubar a 37°C durante la noche (15-20 horas). Un conjunto de pocillos de control se expuso sólo al medio (sin BudR) para obtener un blanco de control de la absorbancia (sólo el substrato) para el ensayo. Después del período de marcado, se eliminó el medio de cultivo, fijándose las células y desnaturalizándose el ADN en una etapa, añadiendo FixDenat (30 min en RT). A continuación, FixDenat se eliminó, añadiéndose el reactivo anti-BudR-peroxidasa y continuando la incubación 90 minutos en RT. Después de eliminar este último, se lavó la placa 3 veces, seguido por la adición de la solución del substrato. Se mantuvo la placa en RT hasta que el desarrollo del color fue suficiente para la detección fotométrica (5-10 minutos). En este momento, se detuvo la reacción añadiendo a cada pocillo 25 microlitros de ácido sulfúrico 1M, seguido por su mezcla durante aproximadamente un minuto en el agitador. Se midió la absorbancia de las mezclas en un lector ELISA a 450 nm, a los 5 minutos después de añadir la solución de detención. La OD a 450 nm constituye una medida del nivel de la incorporación de BudR al ADN, que es proporcional a la tasa de proliferación celular. Para el análisis de datos, el promedio de la absorbancia se graficó con respecto a la concentración de la mezcla ascorbato/metabolitos para obtener una relación dosis-respuesta del efecto antiproliferativo.

## ES 2 309 085 T3

Los resultados de dichos experimentos, que se muestran gráficamente en las Figuras 11-16A, ilustran que:

- Las mezclas que contienen ascorbato, treonato y/o furanona en distintas proporciones, dan lugar a la supresión específica tumoral de la proliferación celular en los tipos celulares del melanoma y del hepatoma.
- El aumento de la proporción de treonato cálcico desde el 1% al 7,5% en la mezcla CA + CT, potencia la actividad antitumoral relativa de la doble combinación, en ambos tipos de células tumorales.
- La adición de furanona al ascorbato cálcico potencia la actividad antiproliferativa en las células del melanoma, exhibiendo la doble combinación CA/FR (proporción de 92,5%/7,5%) una actividad más alta que la mezcla CA/FR simulada (proporción 99,9%/0,1%). Existe aproximadamente una diferencia de 9 veces entre estas dos mezclas con la dosis de 0,05% (OD de 0,008 respecto a 0,088).
- La adición de furanona a la doble mezcla CA + CT, potencia su actividad en ambos tipos celulares tumorales, dando lugar a una actividad óptima la triple combinación CA/CT/FR (proporción 85/7,5/7,5). El efecto potenciador de la adición de la furanona contra el hepatoma es más prominente en la triple mezcla que en la doble combinación (CA + FR). Otros aumentos en el nivel relativo de FR y CT hasta el 10%, no mejoran la actividad antitumoral de la triple combinación (datos que no se muestran).
- Al contrario que en los efectos que se han apreciado en las células tumorales, la triple mezcla CA/CT/FR no suprime la proliferación en las células hepáticas normales, incluso cuando son tratadas con equivalentes del ácido ascórbico en cantidades relativamente altas (92,5/7,5/7,5) comparables con las contenidas en la doble mezcla CA + CT (92,5/7,5).

De este modo, las mezclas dobles de ascorbato cálcico más treonato cálcico (CA + CT) o de ascorbato cálcico más furanona (CA + FR) en proporciones de 92,5:7,5, y las mezclas triples de los tres componentes (CA+CT+FR) en proporciones 85:7,5:7,5, manifiestan una actividad antiproliferativa óptima contra los tipos celulares malignos del hepatoma y del melanoma en un rápido rastreo de inmunoensayo. Dichas mezclas permiten observar efectos antitumorales con equivalentes más bajos de ácido ascórbico que los contenidos en los estándares simulados.

### Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la actividad en solitario de la furanona representativa, 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona, y de la furanona más adriamicina contra las células del hepatoma y melanoma humanos, utilizando el inmunoensayo de proliferación celular basado en la incorporación de BudR al ADN celular.

Un lote nuevamente sintetizado de 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (FR) fue provisto por Inter-Cal Corp, Prescott, Arizona. Se prepararon soluciones máster de almacenamiento (con una fuerza de 0,1% o 0,75%) disolviendo la cantidad deseada de furanona en agua estéril, conservándose congeladas (a -10°C) hasta que se utilizaran. El ascorbato cálcico (CA), el treonato cálcico (CT) y el Éster-C (EC) se obtuvieron también a partir de Inter-Cal. La composición de ascorbato cálcico (calcio-di-) L-ascorbato) dihidrato es ácido L-ascórbico (82,15%), calcio (9,45%) y agua (8,44%). Las mezclas acuosas ascorbato más metabolitos se prepararon disolviendo secuencialmente componentes individuales en agua estéril, para conseguir soluciones máster de almacenamiento de la fuerza deseada. Una triple mezcla de ascorbato cálcico más treonato cálcico más 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona (CA/CT/FR) se preparó con unas proporciones de 85/7,5/7,5 ó 87,5/7,5/5,0. Las reservas máster se mantuvieron a temperatura ambiente durante la realización del experimento. A partir de estas reservas máster, se prepararon reservas de trabajo con una fuerza de 10X mediante dilución en serie, en el día de su utilización, aplicándose a las células en placas de microtitulación, tal como se describe a continuación.

La adriamicina (doxorubicina) se obtuvo de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Las soluciones de almacenamiento se prepararon disolviendo adriamicina (ADR) en agua estéril. Las reservas de guardaron congeladas a -10C, descongelándose antes de utilización. Se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua estéril para obtener soluciones con una fuerza de 10X, y el 0,1 de volumen de las mismas se aplica a la célula en el momento de aplicar el tratamiento.

Las progenies derivadas de tumores humanos diana están formadas por SK-Hep-1, un adenocarcinoma hepático (hepatoma), y Malme-3M, un melanoma maligno. Todos los cultivos de siembra se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA), y se propagaron/mantuvieron en medio de crecimiento que contenía suero, en un incubador humidificado de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Las células SK-Hep-1 se desarrollaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) que contenía sales de Earle más aminoácidos no esenciales suplementados con (FBS, suero fetal bovino) al 10% más antibióticos, y células Maime-3M se cultivaron en medio de McCoy suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15% más antibióticos.

Para el tratamiento, células que crecían exponencialmente se sembraron con una densidad de 1 x 10<sup>4</sup> células por pocillo de placas de microtitulación con 96 pocillos en 0,1-0,2 ml de medio de crecimiento. Después del acoplamiento celular durante la noche a 37°C, los pocillos duplicados se expusieron a varios tratamientos aplicando directamente la décima parte de un volumen de una solución de fuerza 10X. Para los tratamientos implicados en el agente quimioterapéutico, la décima parte de un volumen de diluciones seriadas de adriamicina (en el intervalo de dosis indicado) se aplicó a los pocillos, seguido por la aplicación del adyuvante (por ejemplo, furanona o ascorbato más metabolitos). El

## ES 2 309 085 T3

tratamiento con el adyuvante se repitió diariamente o días alternos (según conviniera) sin cambiar el medio de crecimiento. Los controles no tratados recibieron una cantidad equivalente de agua estéril. Después de -3 tratamientos con el adyuvante, las células se marcaron por la noche con bromodesoxiuridina (BudR), tal como se describe a continuación. (En algunos experimentos, se volvió a proporcionar a los pocillos un volumen idéntico de medio de crecimiento, antes de añadir BudR. Esto dio lugar a una cantidad mayor de la incorporación de BudR al ADN con respecto a la no refluidificación).

Para el marcaje del ADN, el procedimiento siguiente está adaptado y modificado a partir del ensayo ELISA de proliferación celular, (procedimiento que consiste) en el ensayo colorimétrico BudR de Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Cada pocillo tratado se expuso a una décima parte del volumen del medio 10X que contenía BudR y que se volvió a incubar a 37°C durante la noche (15-20 horas). Un conjunto de pocillos de control se expuso solo al medio (sin BudR) para obtener un blanco de control de la absorbancia (sólo el sustrato) para el ensayo. Después del período de marcado, se eliminó el medio de cultivo, fijándose las células y desnaturalizándose el ADN en una etapa, añadiendo FixDenat (30 min en RT). A continuación, FixDenat se eliminó, añadiéndose el reactivo anti-BudR-peroxidasa y continuando la incubación 90 minutos en RT. Después de eliminar este último, se lavó la placa 3 veces, seguido por la adición de la solución del sustrato. Se mantuvo la placa a temperatura ambiente hasta que el desarrollo del color fue suficiente para la detección fotométrica (5-10 minutos). En este momento, se detuvo la reacción añadiendo a cada pocillo 25 microlitros de ácido sulfúrico 1M, seguido por su mezcla durante aproximadamente 1 minuto en el agitador. La absorbancia de las mezclas se midió en un lector ELISA a 450 nm, a los 5 minutos después de añadir la solución de detección. La OD<sub>450 nm</sub> constituye una medida del nivel de la incorporación de BudR al ADN, que es proporcional a la tasa de proliferación celular. Para el análisis de datos, el promedio de la absorbancia se graficó con respecto a la concentración del adyuvante o del medicamento quimioterapéutico de cada tratamiento, para obtener una relación dosis-respuesta del efecto antiproliferativo.

Con un intervalo de concentración en los ensayos del 0,003-0,01%, se apreció una reducción de la proliferación del hepatoma dependiente de la dosis, un 0,01% de furanona dando lugar a una reducción de ~4,6 veces en la síntesis del ADN celular, comparado con el control no tratado. Un perfil similar dependiente de la dosis, se obtuvo en 3 experimentos independientes.

El tratamiento con ADR produjo una inhibición, dependiente de la dosis, de la proliferación del hepatoma, en el intervalo (de dosis que se aplicó) en los ensayos de (0,02 a 0,33 micromoles). Cuando se combinó con furanona (0,001-0,01%), la combinación confirió una inhibición mayor, dando lugar a una potenciación de la inhibición del hepatoma de <2 a 22 veces aproximadamente, con respecto a la obtenida con la correspondiente dosis sólo de ADR. (A partir de dos experimentos independientes, la dosis mínima de furanona que se requirió para producir una doble potenciación de la inhibición de ADR, fue de ~0,0016%, que corresponde aproximadamente a la concentración absoluta de furanona en una solución Ester-C al 1%). Estos experimentos definen el intervalo de concentración de furanona que debe utilizarse en posteriores experimentos de análisis comparativo.

En el intervalo de concentración ensayado (0,001-0,01%), la furanona es más efectiva para inhibir la proliferación del hepatoma que la triple mezcla ascorbato-metabolitos o la Ester-C®, cuando se compara con idéntica concentración absoluta en solución acuosa.

Con la dosis mínima de ADR (0,007 micromoles) y la dosis máxima del adyuvante (0,01%), la furanona potencia 7 veces el efecto inhibitorio de la ADR, comparado con la potenciación de 3,1 y 2,7 veces que se consigue, respectivamente, con la triple mezcla y EC.

La furanona (al 0,1%) potencia de manera consistente el efecto inhibitorio de la ADR a todas las concentraciones del medicamento quimioterapéutico. Al contrario, mientras que la triple mezcla y EC dan lugar a una potenciación comparable con dosis moderadas de ADR (0,136 micromoles), la furanona consigue mejores resultados que cualquiera de las composiciones con dosis bajas de ADR (0,005-0,27 micromoles).

Por tanto, la furanona sola puede inhibir la proliferación celular tanto en las progenies celulares del melanoma como del hepatoma. Además, la furanona puede funcionar como un adyuvante en combinación con un medicamento quimioterapéutico (adriamicina), potenciando los efectos inhibidores en experimentos combinatorios. Sobre una base peso-a-peso, los efectos antiproliferativos y adyuvantes (sinérgicos) de la furanona son más elevados que los de la triple mezcla ascorbato/metabolitos y Ester-C, indicando que la estructura química de la furanona puede contener el componente activo responsable de los efectos antitumorales de las composiciones que contienen ascorbato y sus metabolitos.

Una vez descrita la invención en unos términos que permitan a los expertos en la materia entenderla y ponerla en práctica, y tras haber identificado las formas de realización actualmente preferidas, se reivindica.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición quimioterapéutica contra el cáncer, que comprende doxorubicina y 4-hidroxi-5-metil-3(2H) furona.
2. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento del cáncer.
- 10 3. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

15

20

25

30

35

40

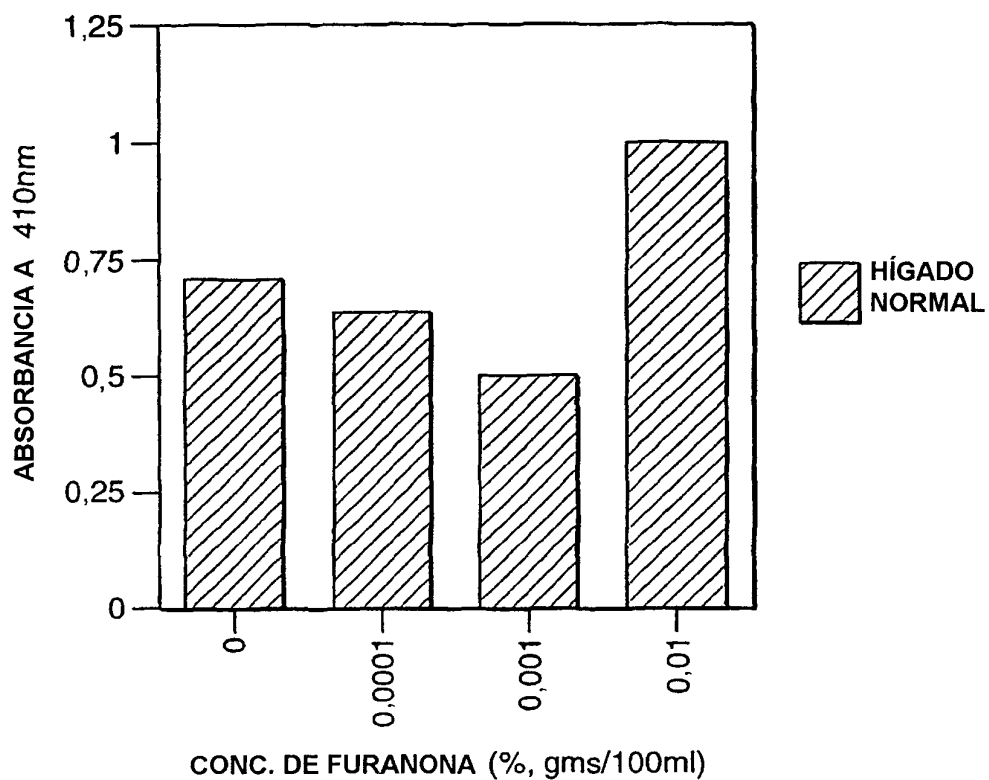
45

50

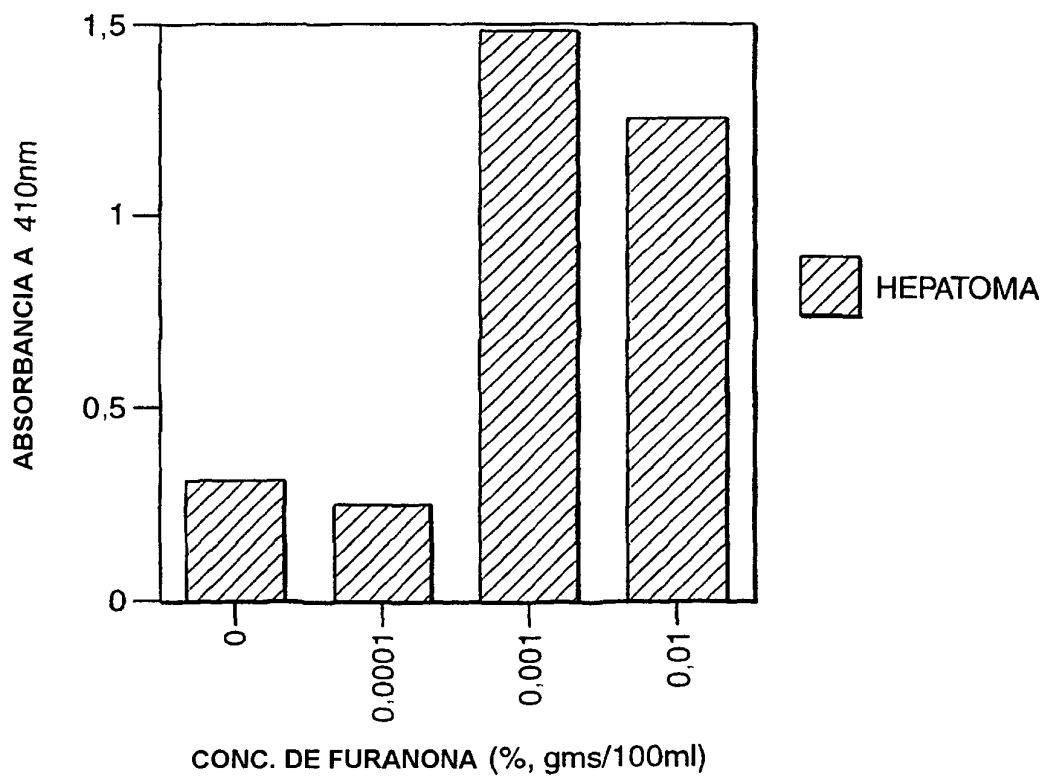
55

60

65



**FIG. 1**



**FIG. 2**

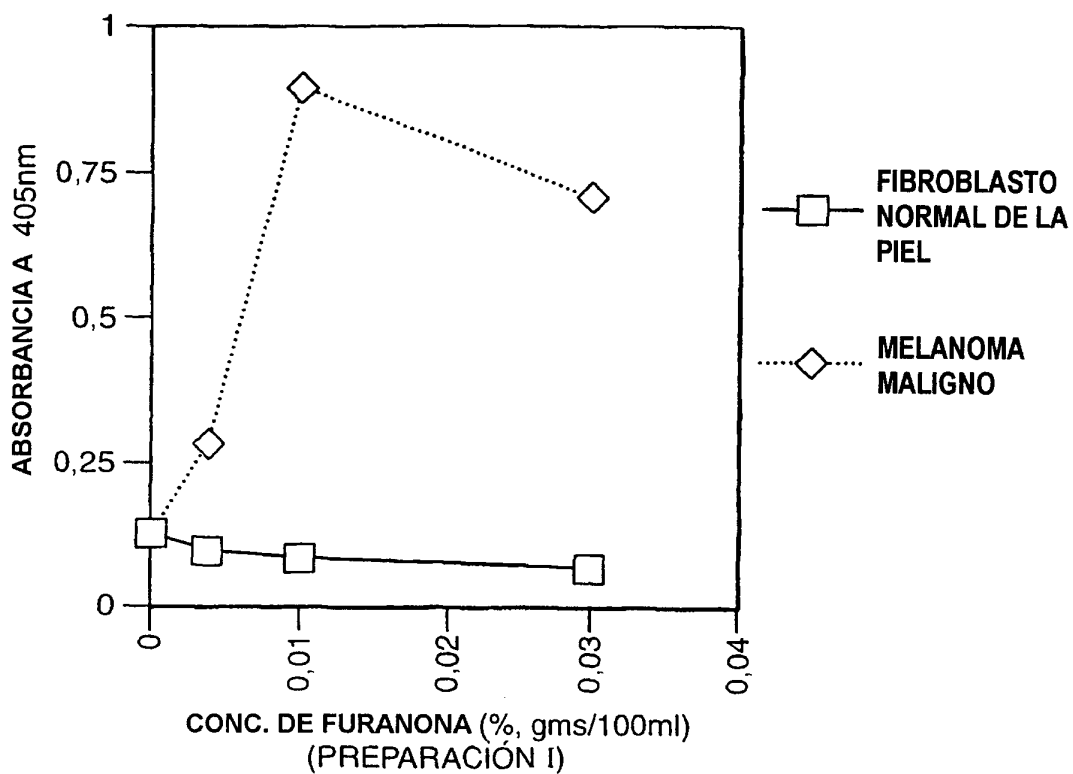


FIG. 3

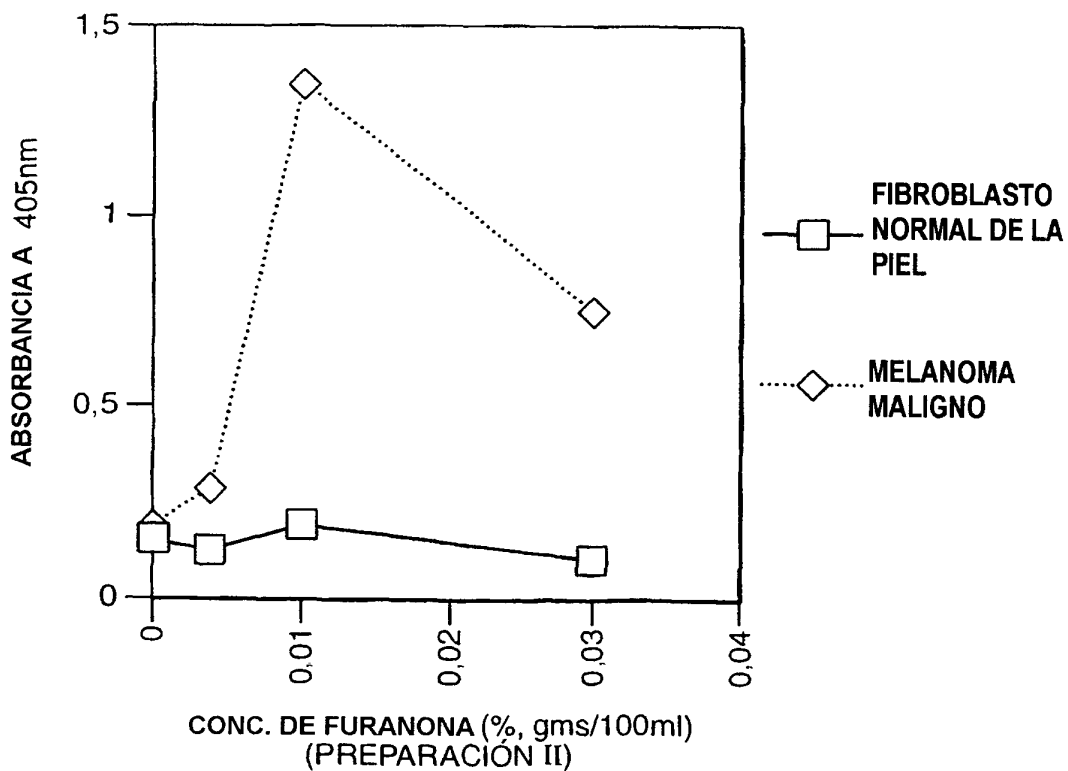
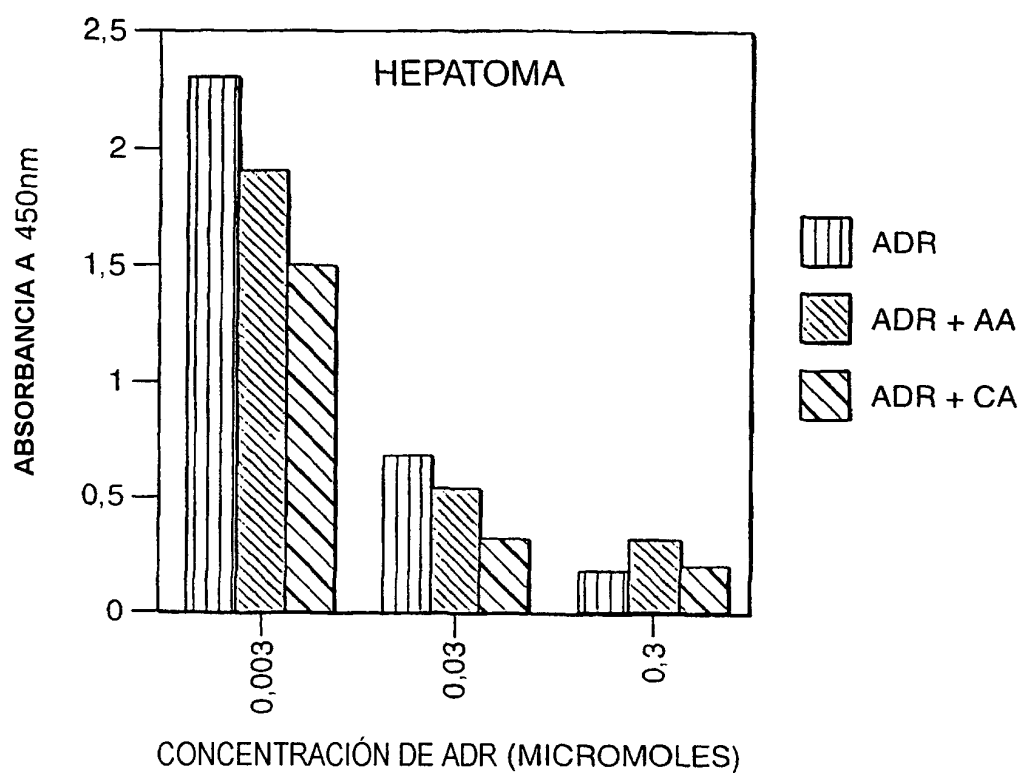
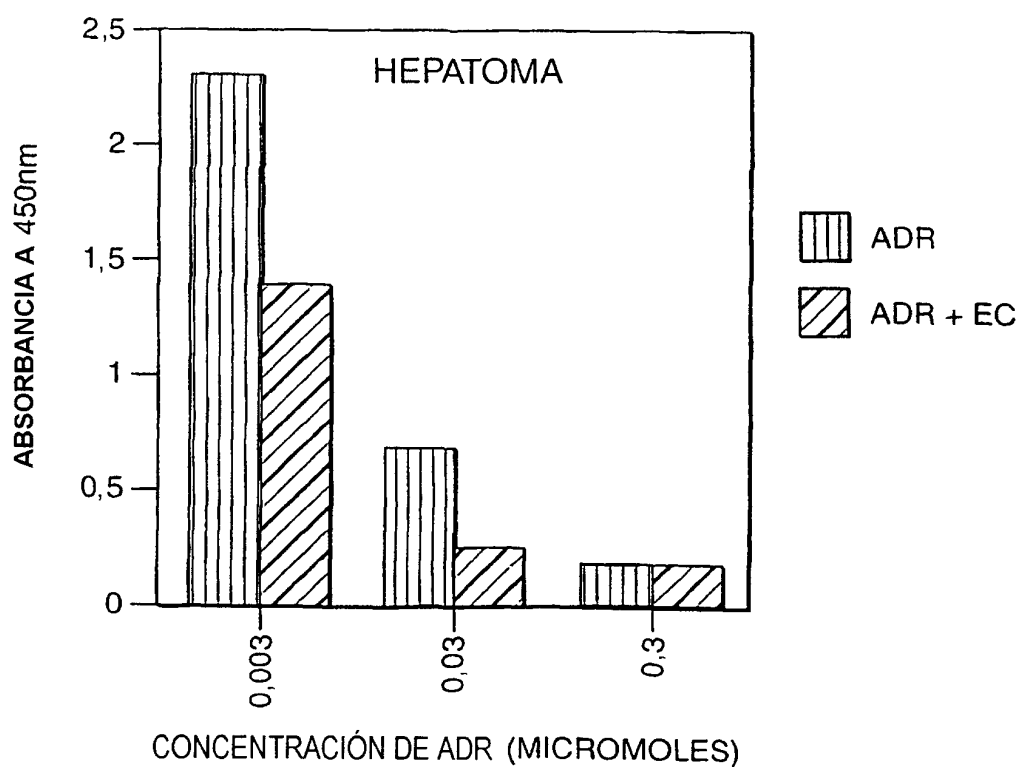


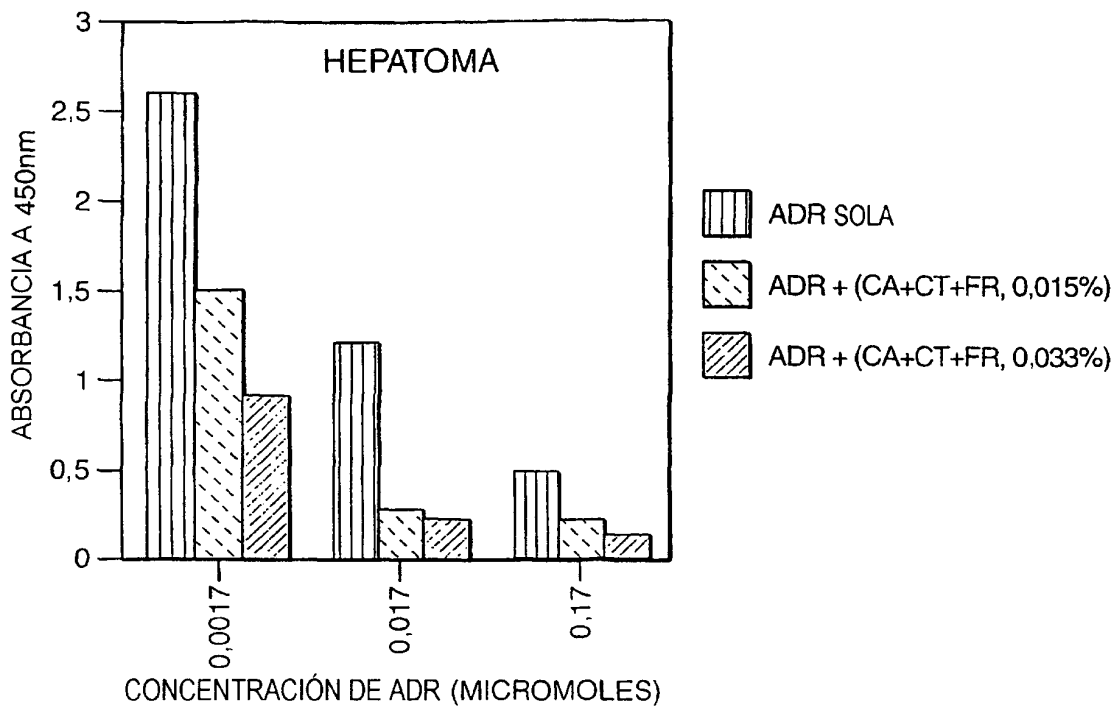
FIG. 4



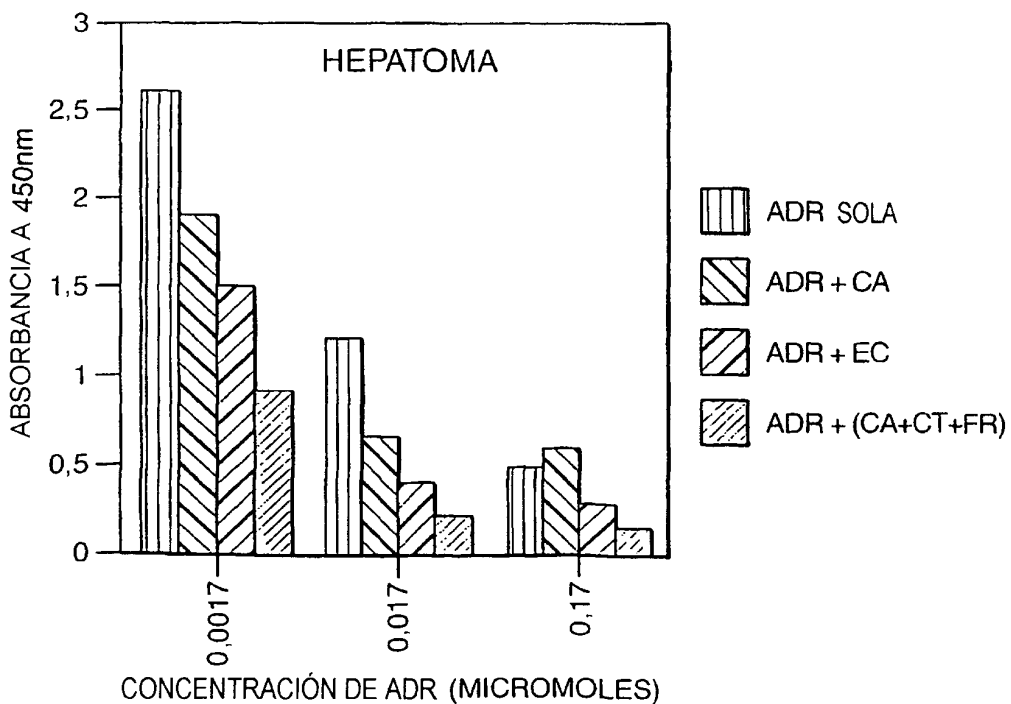
**FIG. 5**



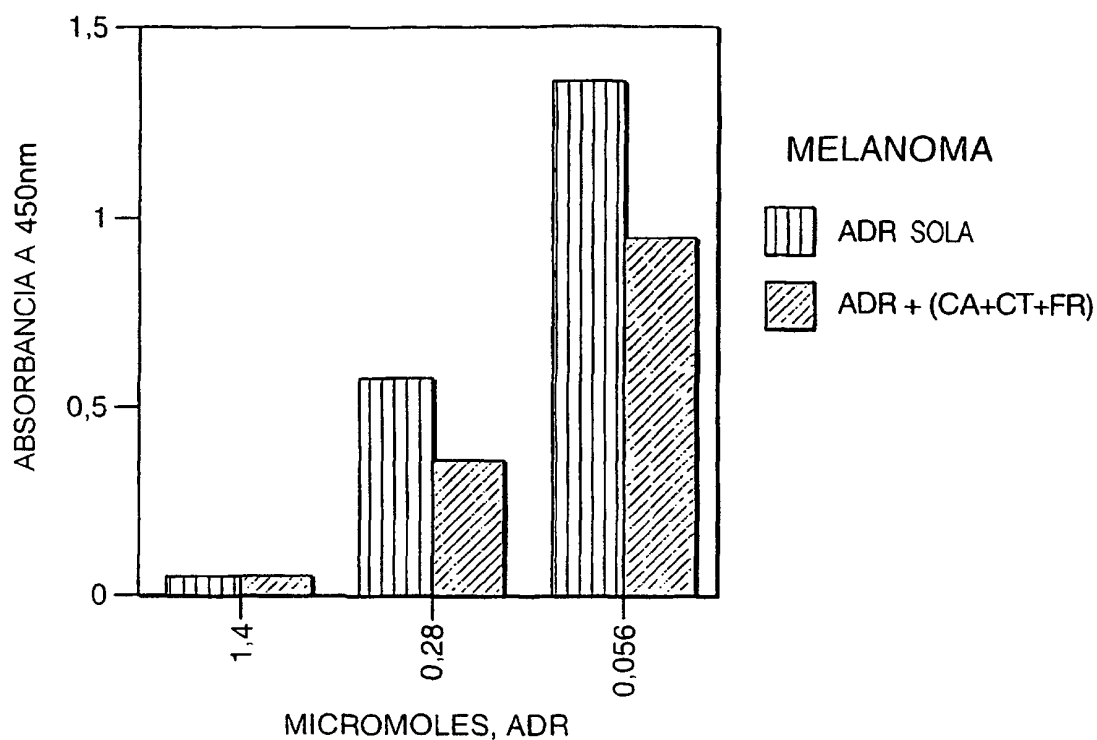
**FIG. 6**



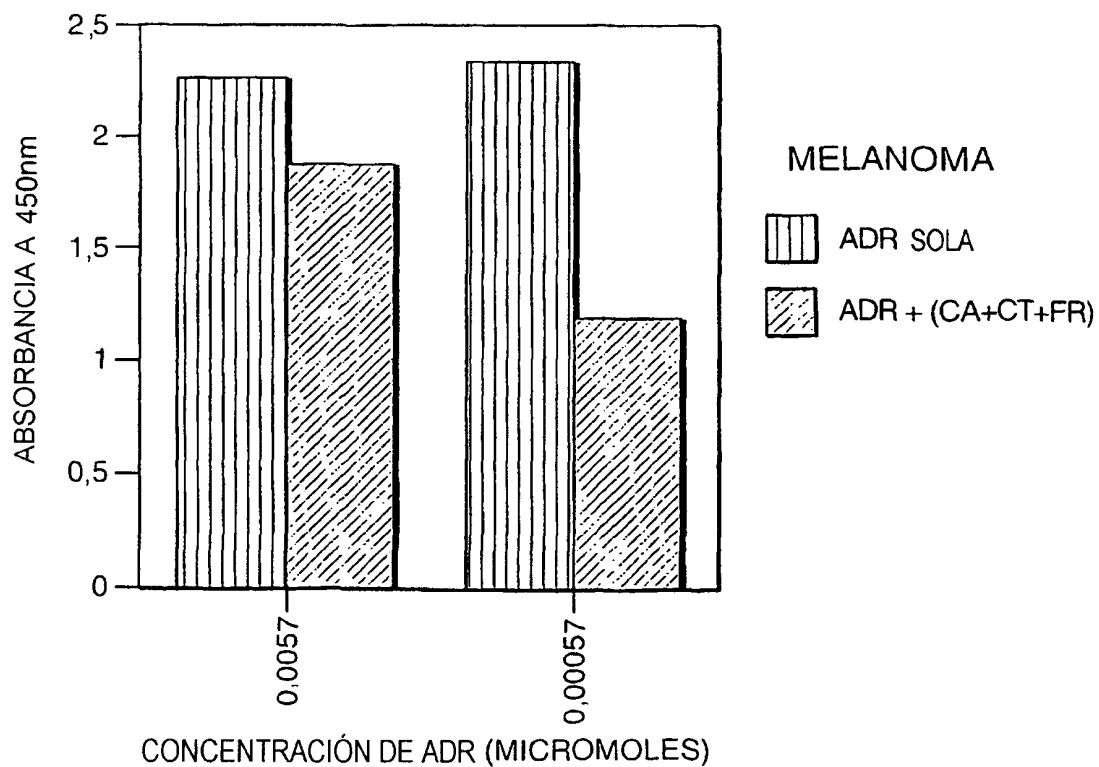
**FIG. 7**



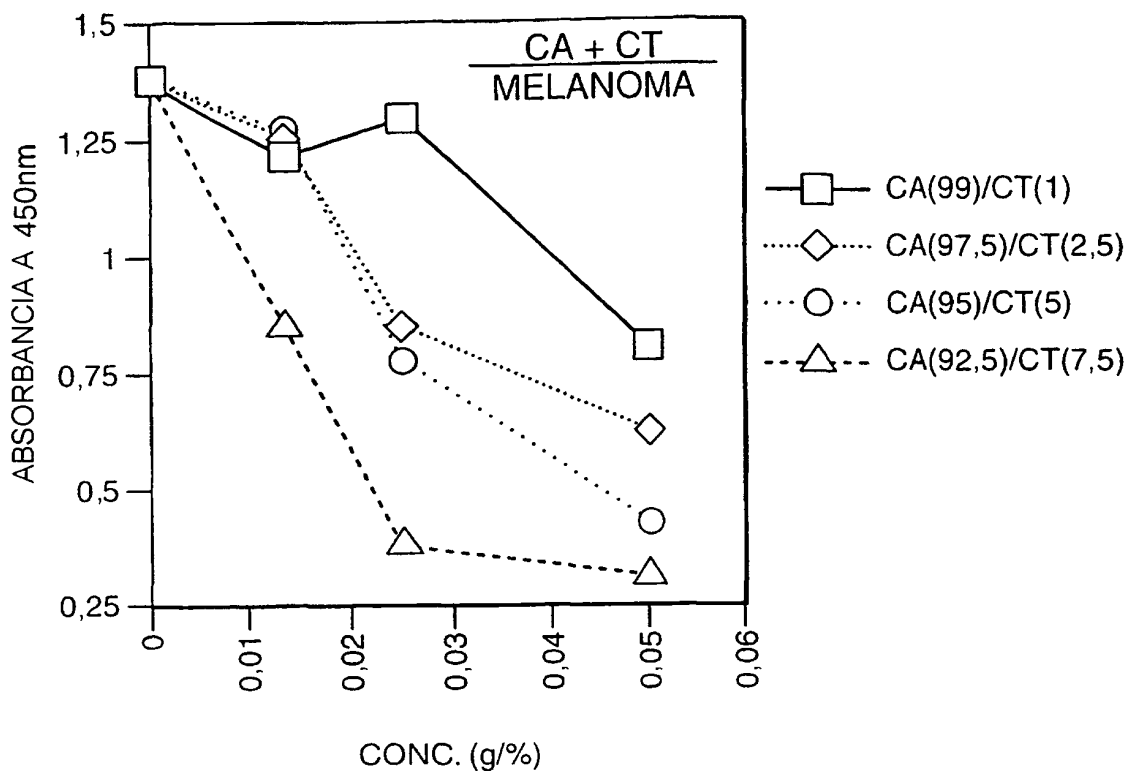
**FIG. 8**



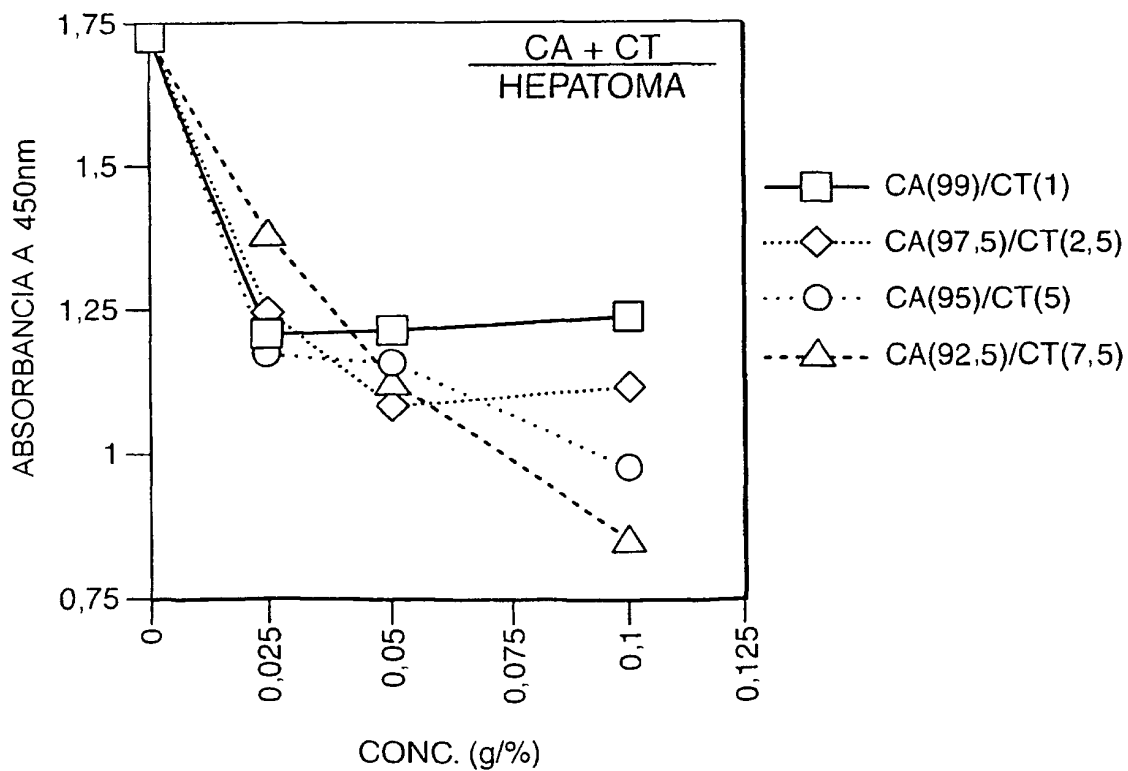
**FIG. 9**



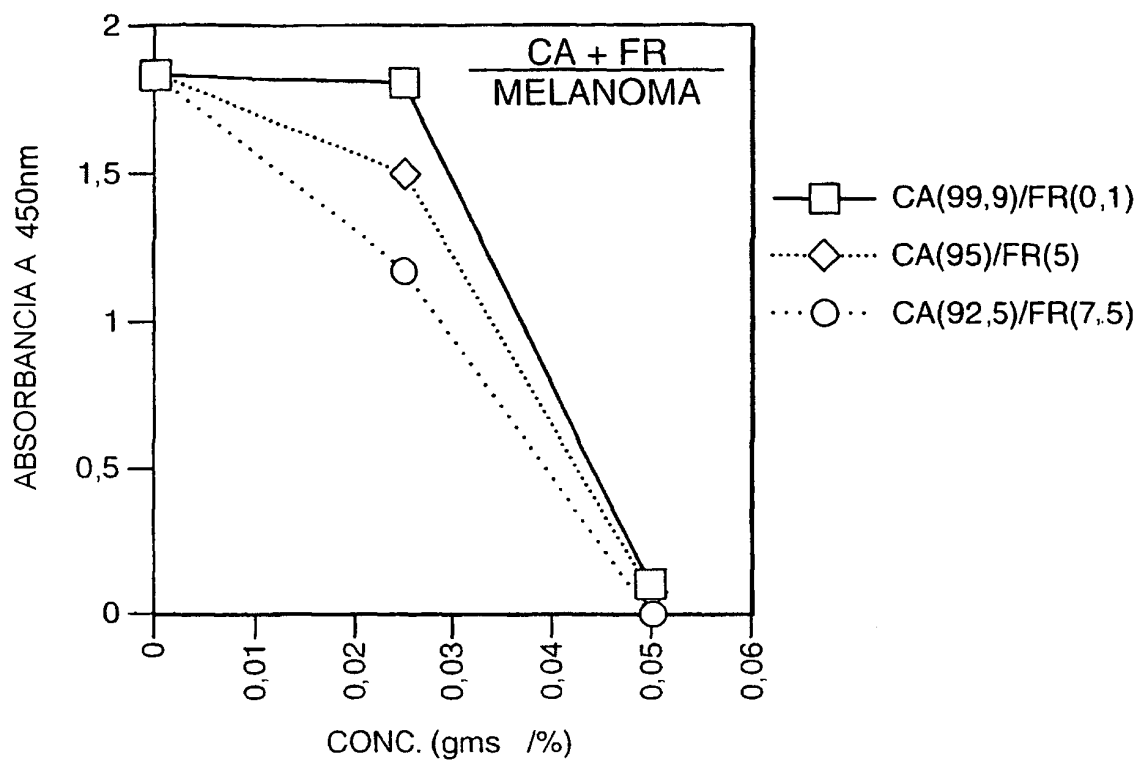
**FIG. 10**



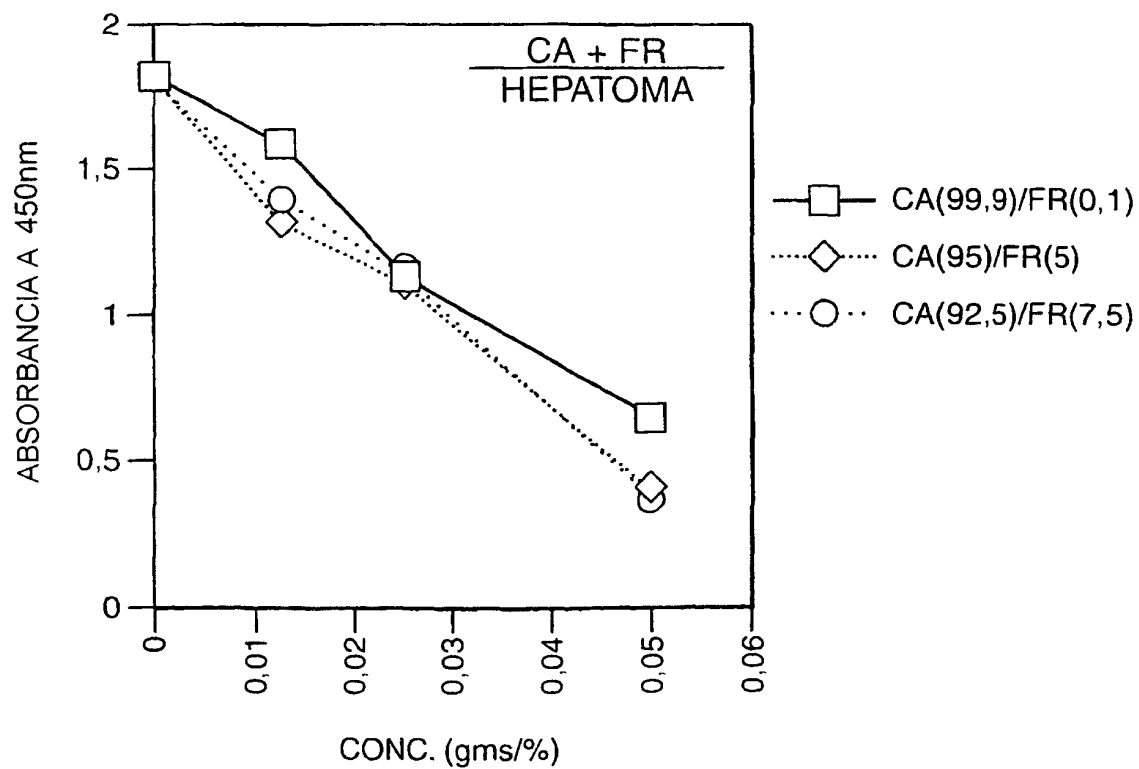
**FIG. 11**



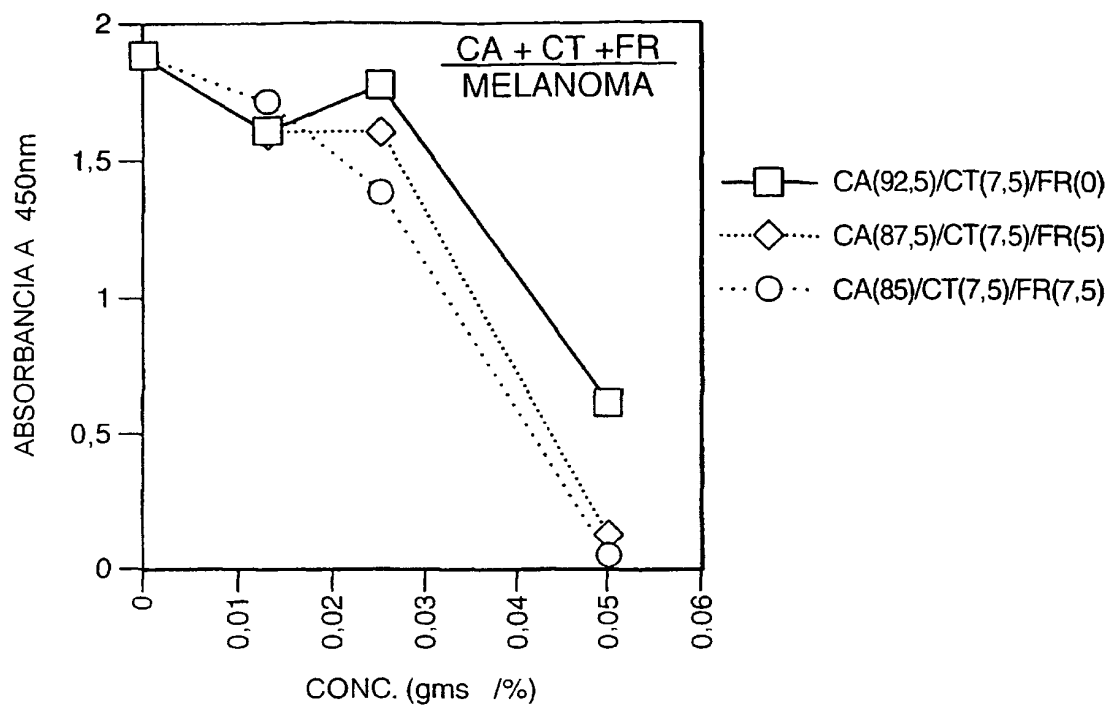
**FIG. 12**



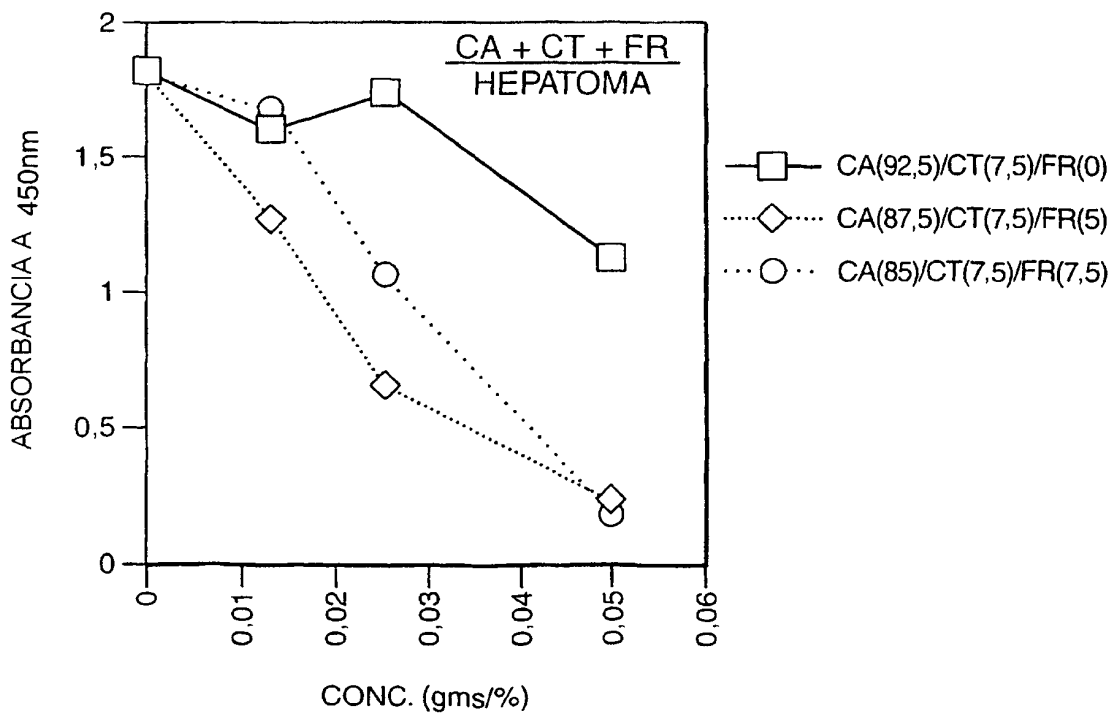
**FIG. 13**



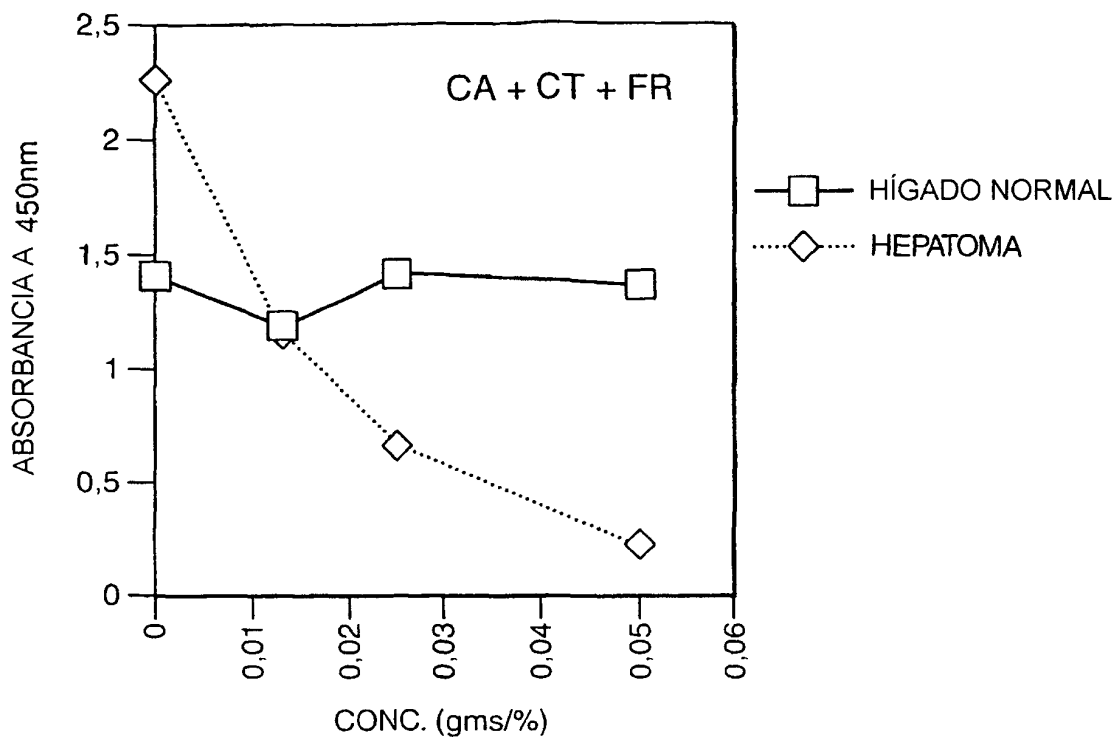
**FIG. 14**



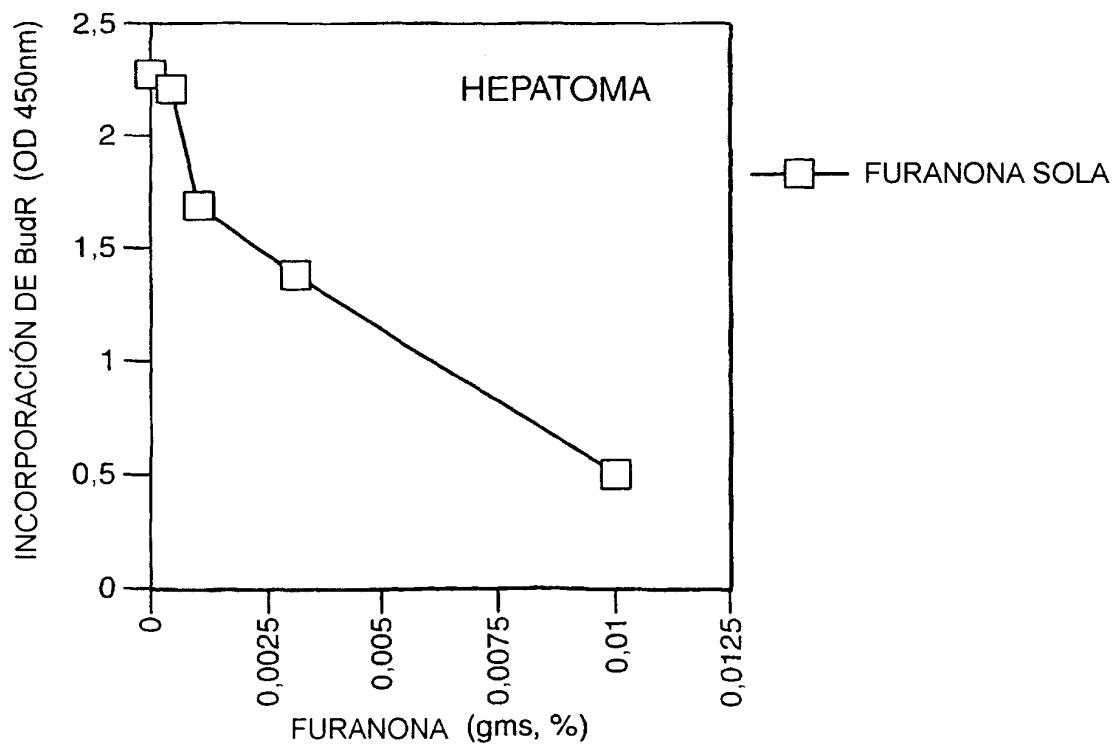
**FIG. 15**



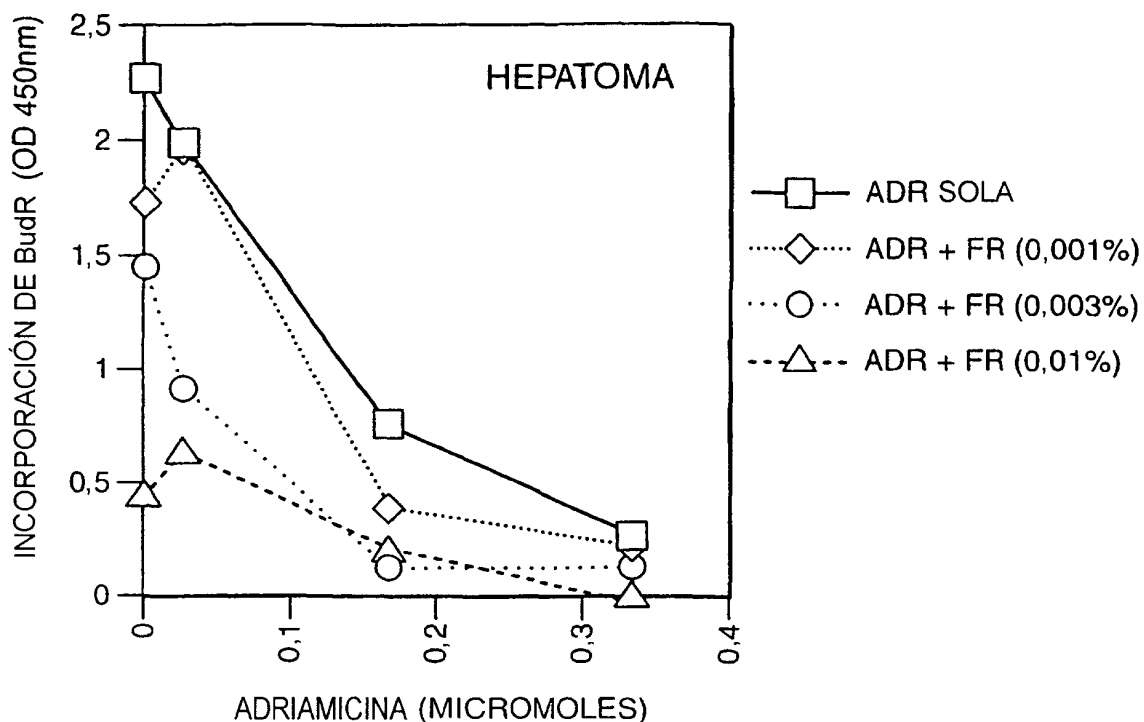
**FIG. 16**



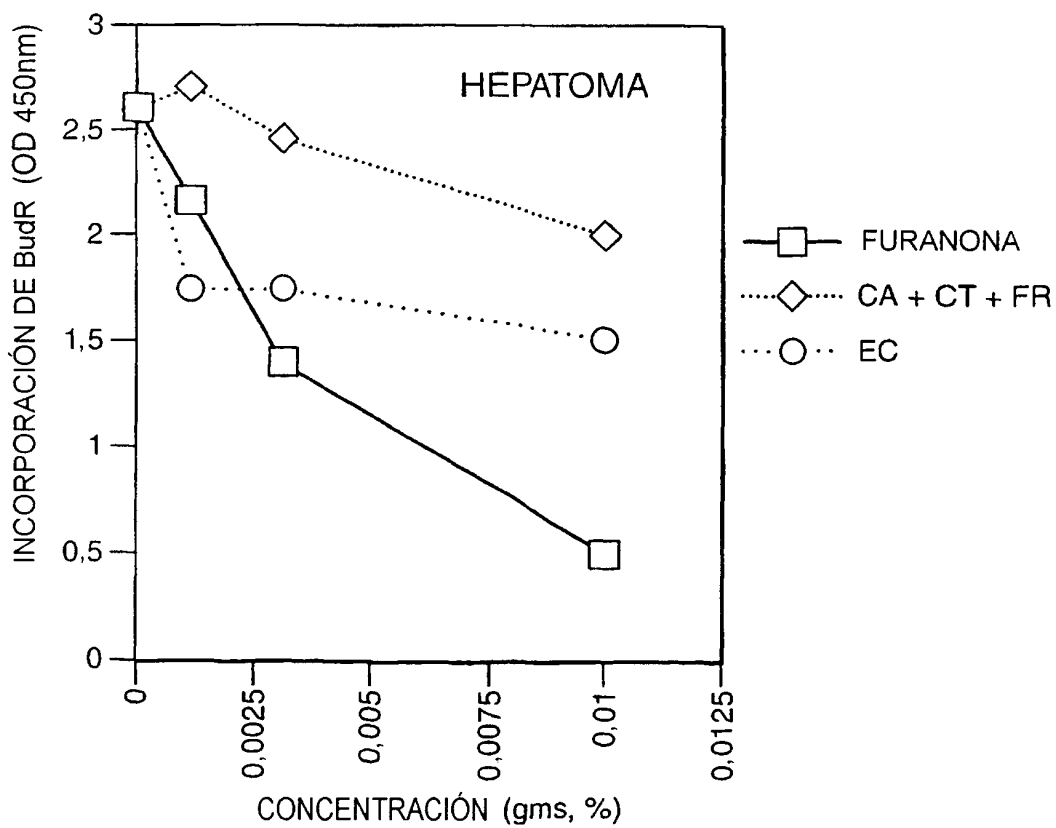
**FIG. 16A**



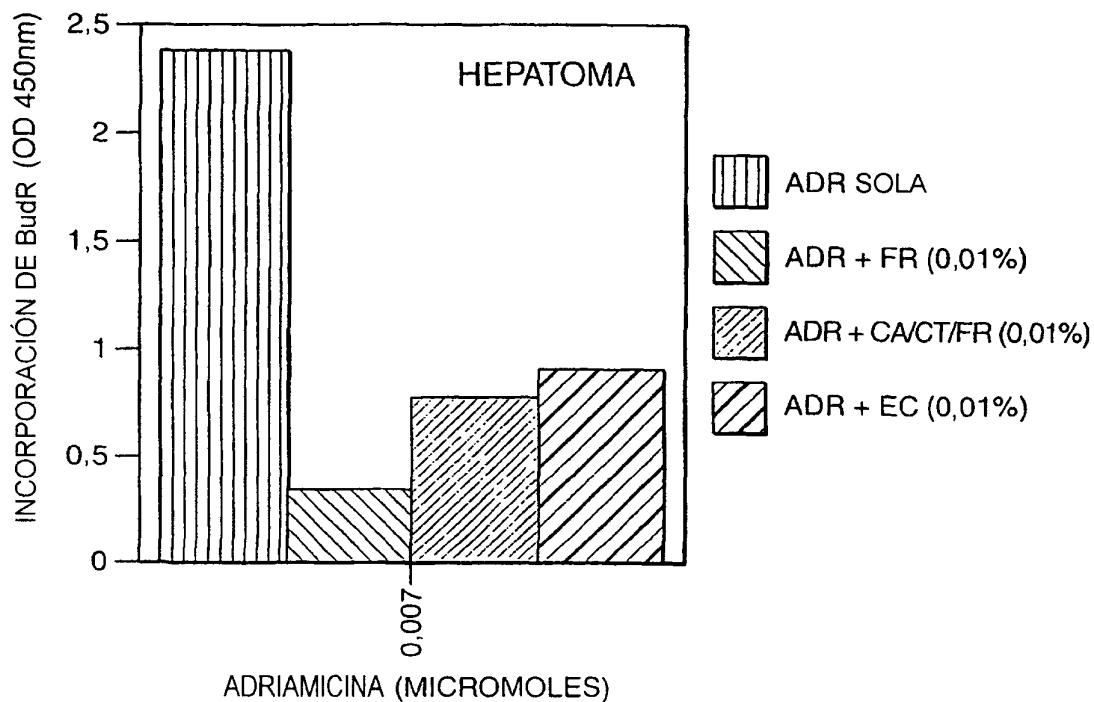
**FIG. 17**



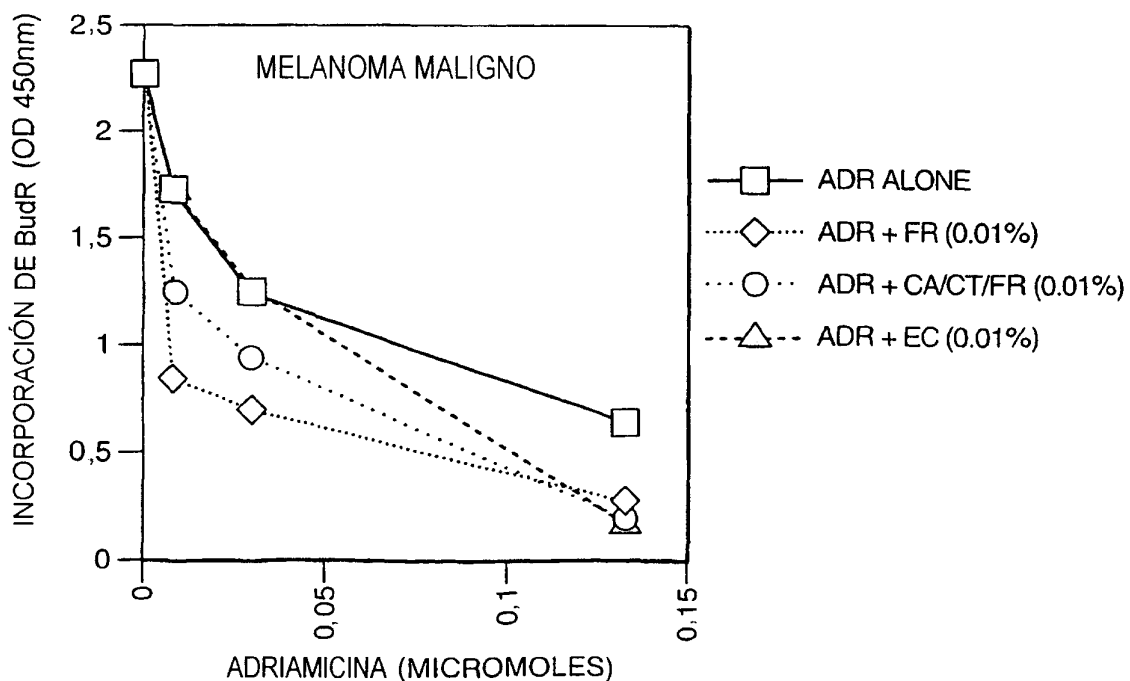
**FIG. 18**



**FIG. 19**



**FIG. 20**



**FIG. 21**