

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 766**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2018** **E 18211226 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023** **EP 3501512**

54 Título: **Composiciones terapéuticas para tratar el cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

20.12.2017 US 201762608549 P

11.10.2018 US 201816157557

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

22.05.2024

73 Titular/es:

GOLDEN BIOTECHNOLOGY CORPORATION
(100.0%)

101 Hudson Street Suite 2100
Jersey City NJ 07302, US

72 Inventor/es:

LIU, SHENG-YUNG y
CHEN, CHIH-MING

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 969 766 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

Composiciones terapéuticas para tratar el cáncer de páncreas

Antecedentes de la invención

El cáncer de páncreas surge cuando las células en el páncreas comienzan a multiplicarse fuera de control y forman una masa. Estas células cancerígenas tienen la capacidad de invadir otras partes del cuerpo. El cáncer de páncreas es la cuarta causa principal de muerte por cáncer en los países occidentales y también es la décima causa principal de muerte por cáncer en Taiwán. Aproximadamente el 60 por ciento del cáncer de páncreas surge en la cabeza del páncreas, y aproximadamente el 21 por ciento invade todo el páncreas.

El cáncer de páncreas puede dividirse en dos grupos generales. La amplia mayoría de casos, aproximadamente el 99%, ocurre en la parte del páncreas que produce enzimas digestivas, conocido como el componente exocrino. Hay varios subtipos de cánceres de páncreas exocrinos, pero su diagnóstico y tratamiento tienen mucho en común. Estas pequeñas minorías de cánceres surgen en el tejido productor de hormonas (endocrino) del páncreas.

La cirugía con la intención de cura es solo posible en alrededor de una quinta parte (20%) de los nuevos casos. Aunque los escáneres de TC ayudan, en la práctica, puede ser difícil determinar si el tumor puede extraerse completamente (su "capacidad de resección") y solo puede ser evidente durante la cirugía que no es posible extraer el tumor con éxito sin dañar otros tejidos vitales. Incluso cuando la operación parece haber tenido éxito, las células cancerígenas se encuentran a menudo alrededor de los bordes ("márgenes") del tejido extraído. Después de la cirugía, puede ofrecerse quimioterapia adyuvante con gemcitabina o 5-FU si la persona está suficientemente bien, después de un periodo de recuperación de uno a dos meses. En personas no adecuadas para cirugía curativa, puede usarse quimioterapia para prolongar la vida o mejorar su calidad de vida.

El documento US 2015/0018296 A1 describe métodos terapéuticos (p. ej., para tratar cánceres) y composiciones que implican compuestos de ciclohexenona donde dichos compuestos inhiben la farnesiltransferasa o Ras.

El documento US 2016/0367539 A1 describe un método para tratar o mejorar los efectos de un cáncer en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de (i) un primer agente anticancerígeno, que es BVD-523 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un segundo agente anticancerígeno, que es un inhibidor de MEK tipo 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar o mejorar los efectos del cáncer.

Chiaravalli, et al., "Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art 2017 and new therapeutic strategies", Cancer Treatment Reviews, 2017, 60, 32-43, informa de un tratamiento del adenocarcinoma ductal pancreático usando compuestos que incluyen gemcitabina y paclitaxel.

Compendio de la invención

La invención se refiere a una composición para usar como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la invención se describen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención se obtendrán por referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos de acompañamiento de los cuales:

Las FIG. 1A/B proporcionan los resultados de la actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con el compuesto 1 ejemplar durante (1A) 48 horas y (1B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica.

Las FIG. 2A/B proporcionan los resultados de actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con erlotinib durante (2A) 48 horas y (2B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica.

Las FIG. 3A/B proporcionan los resultados de actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con 5-FU durante (3A) 48 horas y (3B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica.

Las FIG. 4A/B proporcionan los resultados de actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con gemcitabina durante (4A) 48 horas y (4B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica.

Las FIG. 5A/B proporcionan los resultados de actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con irinotecano durante (5A) 48 horas y (5B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica.

Las FIG. 6A/B proporcionan los resultados de actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con oxaliplatina durante (6A) 48 horas y (6B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad

citotóxica.

Las FIG. 7A/B proporcionan los resultados de actividad citotóxica en células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 tratadas con paclitaxel durante (7A) 48 horas y (7B) 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica.

5 La FIG. 8 muestra el efecto del compuesto 1 con fármacos de quimioterapia, paclitaxel, gemcitabina, 5-FU, oxaliplatina, erlotinib o irinotecano en la citotoxicidad de la línea de células cancerígenas pancreáticas AsPC-1 durante 48 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica. Los valores son medias de tasa de supervivencia $\pm$ EEM. Diferentes letras (a-e) indican una diferencia significativa ($P < 0,05$) para diversos tratamientos.

10 La FIG. 9 muestra la actividad citotóxica del compuesto 1 con fármacos de quimioterapia, paclitaxel, gemcitabina, 5-FU, oxaliplatina, erlotinib e irinotecano, respectivamente. Las células de cáncer de páncreas AsPC-1 se trataron con antroquinol o fórmula de combinación durante o 72 horas. El ensayo MTT se usó para medir la actividad citotóxica. Los valores son medias de la tasa de supervivencia $\pm$ EEM. Diferentes letras (a-g) indican la diferencia significativa ($P < 0,05$) para diversos tratamientos.

15 Las FIG. 10A-C muestran el efecto de la dosis para la combinación de compuesto 1 (también conocido como antroquinol, Aq) con paclitaxel (Px), gemcitabina (Ge) en líneas celulares de cáncer de páncreas. Los gráficos indicaron los valores Fa del tratado de combinación de antroquinol con paclitaxel, antroquinol con gemcitabina, antroquinol más paclitaxel y gemcitabina en las líneas celulares de cáncer de páncreas AsPC-1 (10A), CaPan-2 (10B) y Panc-1 (10C). El eje x representa la dosis de los fármacos en $\mu\text{moles/L}$ y el eje y representa Fa, la fracción de células afectadas (inhibición del crecimiento).

20 Las FIG. 11A-C muestran los resultados del análisis de las combinaciones mediante el compuesto 1 con paclitaxel, gemcitabina en líneas celulares del cáncer de páncreas durante 72 horas. Los gráficos de IC para la combinación de antroquinol (Aq) con paclitaxel (Px), antroquinol con gemcitabina (Ge), antroquinol más paclitaxel y gemcitabina en las líneas celulares del cáncer de páncreas AsPC-1 (11A), CaPan-2 (11B) y Panc-1 (11C). El eje x representa Fa (fracción de células afectadas) y el eje y representa el IC (índice de combinación). IC = 1, < 1 y > 1 indica el efecto aditivo, sinergismo y antagonismo, respectivamente.

25 La FIG. 12 muestra los resultados de los cambios de peso corporal de ratones durante la prueba de actividad antitumoral por el compuesto 1 con fármacos de quimioterapia en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de AsPC-1.

30 La FIG. 13 muestra el efecto de la actividad antitumoral del compuesto 1 más fármacos de quimioterapia en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de AsPC-1. Se hicieron medidas semanales del tamaño del tumor y se representó el volumen tumoral relativo medio como una función de tiempo después del inicio del tratamiento. Cada punto se presentó como media del volumen tumoral.

La FIG. 14 muestra el efecto del compuesto 1 más fármacos de quimioterapia en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de AsPC-1. El porcentaje del volumen tumoral disminuyó significativamente en los grupos de tratamiento del compuesto 1 contenido en combinaciones que se compararon con el grupo de control (T1, aceite de maíz).

35 La FIG. 15 muestra los resultados del análisis del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) del compuesto 1 solo o con fármacos de quimioterapia, paclitaxel y gemcitabina, en el crecimiento del volumen tumoral de AsPC-1. Cada columna se presentó como media de la inhibición del crecimiento tumoral. Los valores son medias $\pm$ EEM. Diferentes superíndices indican la diferencia significativa ($P < 0,05$) entre cada grupo de tratamiento.

40 La FIG. 16 ilustra los resultados de comparación de la foto representativa del xenoinjerto del tumor pancreático de AsPC-1 antes y después del tratamiento con compuesto 1 y/o más fármacos de quimioterapia, respectivamente.

La FIG. 17 ilustra los resultados de comparación de imágenes representativas de ultrasonido del xenoinjerto del tumor pancreático de AspC-1 antes y después del tratamiento con compuesto 1 y/o más fármacos de quimioterapia, respectivamente.

45 Las FIG. 18A/B muestran los resultados de las imágenes (18A) y las figuras (18B) de tumores escindidos en el momento de sacrificio a partir de ratones desnudos macho que portan xenoinjerto de tumor pancreático de AsPC-1 subcutáneo después del 28 días de tratamientos. Se usó ANOVA para analizar la significancia estadística. $*P < 0,05$ se considera que es estadísticamente significativo cuando se compara con el grupo de control (T1, grupo del aceite de maíz).

50 La FIG. 19 muestra los resultados de efecto inhibidor del compuesto 1 solo o con fármacos de quimioterapia, paclitaxel y gemcitabina, en el crecimiento del tumor sólido de AsPC-1. Cada columna se presentó como media de tasa inhibidora tumoral (TIR, por sus siglas en inglés). Los valores son medias de TIR $\pm$ EEM. Los diferentes superíndices indican la diferencia significativa ($P < 0,05$) entre cada grupo de tratamiento.

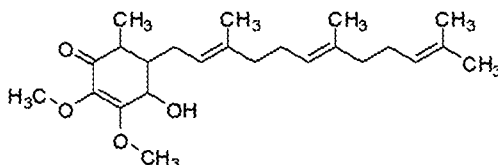
Descripción detallada de la invención

La cirugía con la intención de cura solo es posible en alrededor de una quinta parte (20%) de los nuevos casos. Aunque

la cirugía curativa ya no implica las tasas muy altas de muerte que se daban hasta los años 80, una alta proporción de gente (aproximadamente el 30-45%) aún tiene que tratarse por una enfermedad posoperatoria que no está provocada por el propio cáncer. La complicación más común de la cirugía es la dificultad en el vaciado del estómago. Después de la cirugía, puede ofrecerse la quimioterapia adyuvante con gemcitabina o 5-FU si la persona está suficientemente bien, después de un periodo de recuperación de uno a dos meses. La gemcitabina se aprobó por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 1997, después de que un ensayo clínico presentó mejoras en la calidad de vida y una mejora de 5 semanas en la duración mediana de supervivencia en personas con cáncer de páncreas avanzado. La quimioterapia que usa gemcitabina sola fue el patrón durante una década, ya que un número de ensayos que la probaban en combinación con otros fármacos no pudieron demostrar resultados significativamente mejores.

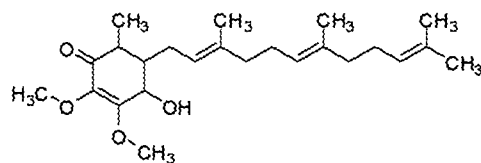
El régimen de quimioterapia de FOLFIRINOX que usa cuatro fármacos se encontró más eficaz que la gemcitabina, pero con efectos secundarios sustanciales, y por consiguiente solo es adecuado para personas con buen estado funcional. Esto es también cierto para paclitaxel unido a proteína (nab-paclitaxel), que consiguió la licencia de la FDA en 2013 para el uso con gemcitabina en cáncer de páncreas. Sin embargo, los cambios de los últimos años solo han aumentado los tiempos de supervivencia en unos pocos meses.

Un método para tratar el cáncer de páncreas en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita un compuesto de ciclohexanona se presentó en el número de patente de EE.UU. 8,236,860. Un compuesto ejemplar, antroquinonol se estudió para tratar el cáncer de páncreas usando el modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano de PANC-1 ortotópico. Cuatro grupos de ratones se trataron con 30 mg/kg, 60 mg/kg, 90 mg/kg, y vehículo de control, respectivamente. El tratamiento con antroquinonol a 30, 60 y 90 mg/kg produjo una actividad antitumoral eficaz con volúmenes tumorales y pesos tumorales medios estadísticamente significativamente más pequeños en los tres niveles de dosificación en comparación al control de vehículo. Aunque se mostró que el antroquinonol era un buen candidato como fármaco para tratar el cáncer de páncreas, no se consideró usarlo en ninguna terapia de combinación. Sin embargo, se encuentra inesperadamente que existía un efecto sinérgico en una terapia de combinación que comprende



y uno o más agentes anticancerígenos, en donde el uno o más agentes anticancerígenos es erlotinib, 5-FU, oxaliplatina, irinotecano, gemcitabina, paclitaxel o una combinación de los mismos.

La invención se refiere a composiciones para el uso en el tratamiento de cáncer de páncreas en un sujeto que comprende



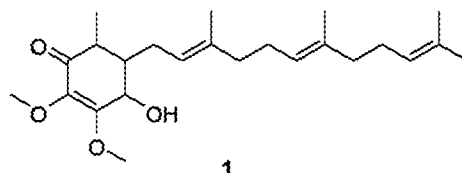
y uno o más agentes anticancerígenos, en donde el uno o más agentes anticancerígenos es erlotinib, 5-FU, oxaliplatina, irinotecano, gemcitabina, paclitaxel o una combinación de los mismos.

Por ejemplo, el paclitaxel se clasifica como un "alcaloide vegetal", un "taxano" y un "agente antimicrotúbulo". Se usa para tratar un número de tipos de cáncer como cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón, sarcoma de Kaposi, cáncer de cuello de útero y cáncer de páncreas. El paclitaxel unido a albúmina (marca comercial Abraxane, también denominado nab-paclitaxel) es una formulación alternativa donde el paclitaxel está unido a nanopartículas de albúmina. El paclitaxel se conoce por tener algunos efectos secundarios comunes que incluyen náuseas y vómitos, pérdida de apetito, cambio en el gusto, pelo adelgazado y quebradizo, dolor en las articulaciones de los brazos o piernas que duran dos o tres días, cambios en el color de las uñas, y hormigueo en las manos o los pies. El paclitaxel es uno de los diversos fármacos citoesqueléticos que están dirigidos a la tubulina. Las células tratadas con paclitaxel tienen defectos en el montaje del huso mitótico, la segregación cromosómica y la división celular. A diferencia de otros fármacos que se dirigen a la tubulina como la colchicina que inhiben el montaje de microtúbulos, el paclitaxel estabiliza el polímero de microtúbulos y lo protege del desmontaje.

Otro fármaco anticancerígeno ejemplar, la gemcitabina es un análogo de nucleósido usado como quimioterapia para tratar un número de tipos de cáncer que incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas y cáncer de vejiga. Los efectos secundarios normales incluyen supresión de médula ósea, problemas hepáticos y renales, náuseas, fiebre, sarpullidos, falta de aliento y pérdida de cabello. El uso durante

el embarazo probablemente dará por resultado daño en el bebé. La gemcitabina está en la familia de medicación del análogo de nucleósido. Funciona bloqueando la creación de nuevo ADN que da por resultado la muerte celular.

En algunas realizaciones, el compuesto de ciclohexenona como se define en las reivindicaciones se prepara de forma sintética o semisintética a partir de cualquier material de partida adecuado. En otras realizaciones, el compuesto de ciclohexenona se prepara por fermentación, o similar. Por ejemplo, el compuesto 1 se aísla de extractos de disolvente orgánico o se prepara sintéticamente o semisintéticamente.



En algunas realizaciones, los métodos para tratar el cáncer de páncreas descritos en la presente memoria comprenden administrar un agente de inmunoterapia. El agente de inmunoterapia incluye, sin limitación, cualquier célula inmune viva que pueda administrarse a un paciente, y/o anticuerpos específicos para una célula diana (p. ej., una célula tumoral como la célula de cáncer de páncreas). Preferiblemente, el agente de inmunoterapia es una célula NK o una célula T, o una modificación o derivado de las mismas.

Inmunoterapia

La inmunoterapia es el "tratamiento de la enfermedad induciendo, potenciando o suprimiendo una respuesta inmune". Las inmunoterapias diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmune se clasifican como inmunoterapias de activación, mientras que las inmunoterapias que reducen o suprimen se clasifican como inmunoterapias de supresión.

En algunas realizaciones, el agente de inmunoterapia es un anticuerpo anticancerígeno. Ejemplos no limitantes incluyen trastuzumab (Herceptin®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®), ipilimumab (Yervoy®), rituximab (Rituxan®), alemtuzumab (Campath®), ofatumumab (Arzerra®), ozogamicina de gemtuzumab (Mylotarg®), vedotina de brentuximab (Adcetris®), tiuxetano de ⁹⁰Y-ibritumomab (Zevalin®), ¹³¹I-tositumomab (Bexxar®), anticuerpo de anti-muerte programada 1 (anti-PD-1) como nivolumab, pembrolizumab y similares.

Cierta terminología farmacéutica y médica

A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos usados en esta solicitud, que incluye la memoria y las reivindicaciones, tienen las definiciones dadas a continuación. Debe tenerse en cuenta que, como se usa en la memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopia de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología. En esta solicitud, el uso de "o" o "y" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye" además de otras formas como "incluir", "incluye" e "incluido" no es limitante. Los encabezados de sección usados en la presente memoria son para fines organizativos solo y no se van a construir como limitantes del asunto descrito.

Un grupo "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático. El grupo alquilo puede ser un grupo alquilo saturado (que significa que no contiene ningún doble enlace carbono-carbono o triple enlace carbono-carbono) o el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo insaturado (que significa que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono o triple enlace carbono-carbono). El resto alquilo, sea saturado o insaturado, puede estar ramificado o tener cadena lineal.

El grupo "alquilo" puede tener 1 a 12 átomos de carbono (cuando aparece en la presente memoria, un intervalo numérico como "1 a 12 se refiere a cada número entero en el intervalo dado; p. ej., "1 a 12 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 12 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la ocurrencia del término "alquilo" donde no se designa un intervalo numérico). El grupo alquilo de los compuestos descritos en la presente memoria puede designarse como, "alquilo C₁-C₁₂", "alquilo C₁-C₈" o designaciones similares. Por medio de ejemplo solo, "alquilo C₁-C₈" indica que hay uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho átomos de carbono en la cadena alquilo. En un aspecto el alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero no están limitados de ninguna manera a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, butilo terciario, pentilo, neopentilo, hexilo, alilo, but-2-enilo, but-3-enilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, y similares. En un aspecto, un alquilo es un alquilo C₁-C₈.

El término "alquilenos" se refiere a un radical alquilo divalente. Cualquiera de los grupos alquilo monovalentes mencionados anteriormente puede ser un alquilenos por extracción de un segundo átomo de hidrógeno del alquilo. En

un aspecto, el alquileo es un alquileo C_1-C_{12} . En otro aspecto, un alquileo es un alquileo C_1-C_8 . Grupos alquileo típicos incluyen, pero no se limitan a, $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-CH_2C(CH_3)_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ y similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un anillo aromático en donde cada uno de los átomos que forman el anillo es un átomo de carbono. Los anillos arilo están formados por cinco, seis, siete, ocho, nueve o más de nueve átomos de carbono. Los grupos arilo están opcionalmente sustituidos. En un aspecto, un arilo es un fenilo o un naftalenilo. En un aspecto, un arilo es un fenilo. En un aspecto, un arilo es un arilo C_6-C_{10} . Dependiendo de la estructura, un grupo arilo puede ser un monorradical o un dirradical (es decir, un grupo arileno). En un aspecto, un arileno es un arileno C_6-C_{10} . Los arilenos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, fenil-1,2-eno, fenil-1,3-eno y fenil-1,4-eno.

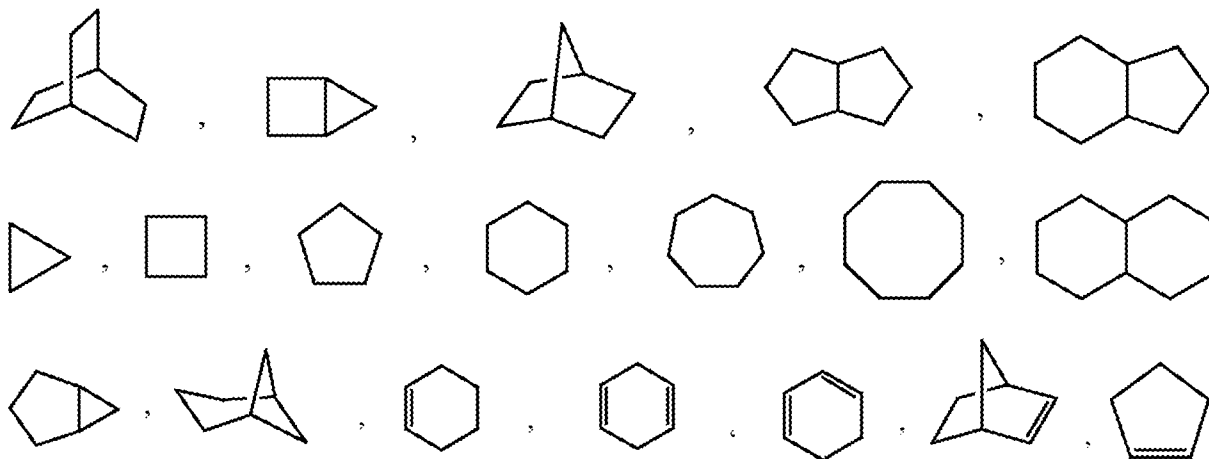
El término "aromático" se refiere a un anillo plano que tiene un sistema de electrones π deslocalizados que contienen $4n+2$ electrones π , donde n es un número entero. Los anillos aromáticos pueden estar formados por cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez átomos. Los compuestos aromáticos están opcionalmente sustituidos. El término "aromático" incluye tanto grupos arilo carbocíclicos ("arilo", p. ej., fenilo) como grupos arilo heterocíclicos (o "heteroarilo" o "heteroaromático") (p. ej., piridina). El término incluye grupos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares de átomos de carbono adyacentes).

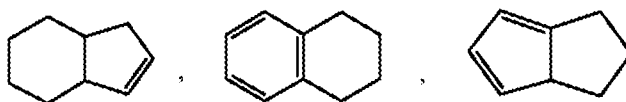
El término "halo" o, alternativamente, "halógeno" o "haluro" significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

El término "alqueno" como se usa en la presente memoria, significa un hidrocarburo lineal, de cadena ramificada, o cíclico (en cuyo caso, se conocería también como un "cicloalqueno") que contiene de 2-10 carbonos y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono formado por la eliminación de dos hidrógenos. El grupo alqueno de los compuestos descritos en la presente memoria pueden designarse como "alqueno C_2-C_{10} ", "alqueno C_2-C_8 " o designaciones similares. Por medio de ejemplo solo, "alqueno C_2-C_8 " indica que hay dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho átomos de carbono en la cadena alqueno. En algunas realizaciones, dependiendo de la estructura, un grupo alqueno es un monorradical o un dirradical (es decir, un grupo alqueno). En algunas realizaciones, los grupos alqueno están opcionalmente sustituidos. Ejemplos ilustrativos de alqueno incluyen, pero no se limitan a, etenilo, 2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 3-butenilo, 4-pentenilo, 5-hexenilo, 2-heptenilo, 2-metil-1-heptenilo y 3-cecenilo.

El término "alquino" como se usa en la presente memoria, significa un hidrocarburo lineal, de cadena ramificada o cíclico (en cuyo caso, se conocería también como un "cicloalquino") que contiene de 2-10 carbonos y que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono formado mediante la eliminación de cuatro hidrógenos. Dependiendo de la estructura, el grupo alquino es un monorradical o un dirradical (es decir, un grupo alquino). El grupo alquino de los compuestos descritos en la presente memoria pueden designarse como "alquino C_2-C_{10} ", "alquino C_2-C_8 " o designaciones similares. Por medio de ejemplo solo, "alquino C_2-C_8 " indica que hay dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho átomos de carbono en la cadena de alquino. En algunas realizaciones, los grupos alquino están opcionalmente sustituidos. Ejemplos ilustrativos de alquino incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo, y similares.

El término "cicloalquilo" como se usa en la presente memoria, significa un radical monocíclico o policíclico que contiene solo carbono e hidrógeno, e incluye aquellos que están saturados, parcialmente insaturados o totalmente insaturados. Los grupos cicloalquilo incluyen grupos que tienen de 3 a 10 átomos anulares. Ejemplos representativos de compuestos cíclicos incluyen pero no se limitan a, los siguientes restos:





En algunas realizaciones, dependiendo de la estructura, un grupo cicloalquilo es un monorradical o un dirradical (p. ej., un grupo cicloalquileo).

Los términos “haloalquilo”, “haloalqueno”, “haloalquino” y “haloalcoxi”, como se usan en la presente memoria, incluyen estructuras alquilo, alqueno, alquino y alcoxi en que al menos un hidrógeno está sustituido con un átomo de halógeno. En ciertas realizaciones en que dos o más átomos de hidrógeno están sustituidos con átomos de halógeno, los átomos de halógeno son todos iguales entre sí. En otras realizaciones en que dos o más átomos de hidrógeno están sustituidos con átomos de halógeno, los átomos de halógeno no son todos iguales entre sí. Los términos “fluoroalquilo” y “fluoroalcoxi” incluyen grupos haloalquilo y haloalcoxi, respectivamente, en que el halo es flúor. En ciertas realizaciones, los haloalquilos están opcionalmente sustituidos.

El término “aceptable” con respecto a una formulación, composición o ingrediente, como se usa en la presente memoria, significa que no tiene un efecto perjudicial persistente en la salud general del sujeto a tratar.

Antrodia es un género de hongos en la familia *Meripilaceae*. La especie *Antrodia* tiene cuerpos fructíferos que típicamente son planos o se extienden en la superficie de crecimiento, con el himenio expuesto al exterior; los bordes pueden girarse para formar ménsulas estrechas. La mayoría de especies se encuentran en bosques templados y boreales, y provocan podredumbre marrón.

El término “vehículo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos químicos relativamente no tóxicos o agentes que facilitan la incorporación de un compuesto en células o tejidos.

Los términos “co-administración” o similares, como se usan en la presente memoria, pretenden abarcar la administración de los agentes terapéuticos seleccionados a un único paciente, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en que los agentes se administran mediante la misma o diferente ruta de administración o al mismo o diferente tiempo.

El término “diluyente” se refiere a compuestos químicos que se usan para diluir el compuesto de interés antes de la distribución. Los diluyentes pueden usarse además para estabilizar compuestos porque pueden proporcionar un entorno más estable. Las sales disueltas en disoluciones tamponadas (que también pueden proporcionar control o mantenimiento del pH) se utilizan como diluyentes en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a una solución salina tamponada con fosfato.

Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en la presente memoria, se refieren a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas de la enfermedad o condición a tratar. El resultado puede ser reducción y/o alivio de las señales, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una “cantidad eficaz” para usos terapéuticos es la cantidad de la composición que comprende un compuesto como se describe en la presente memoria necesario para proporcionar una disminución clínicamente significativa en los síntomas de la enfermedad. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse usando técnicas, como un estudio de aumento de dosis.

Un “metabolito” de un compuesto descrito en la presente memoria es un derivado de ese compuesto que se forma cuando el compuesto se metaboliza. El término “metabolito activo” se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto que se forma cuando se metaboliza el compuesto. El término “metabolizado”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la suma de los procesos (que incluyen, pero no se limitan a, reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas) por el que una sustancia particular se cambia por un organismo. Por consiguiente, las enzimas pueden producir alteraciones estructurales específicas a un compuesto. Por ejemplo, el citocromo P450 cataliza una variedad de reacciones oxidativas y reductoras mientras las uridina difosfato glucuroniltransferasas catalizan la transferencia de una molécula de ácido glucurónico activada a alcoholes aromáticos, alcoholes alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas y grupos sulfhidrido libres. Los metabolitos de los compuestos descritos en la presente memoria se identifican opcionalmente mediante la administración de compuestos a un huésped y el análisis de muestras de tejido del huésped, o mediante incubación de compuestos con células hepáticas *in vitro* y análisis de los compuestos resultantes.

El término “combinación farmacéutica” como se usa en la presente memoria, significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los ingredientes activos. El término “combinación fija” significa que los ingredientes activos, p. ej., un compuesto (es decir, un compuesto de ciclohexenona descrito en la presente memoria) y un co-agente, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosificación. El término “combinación no fija” significa que los ingredientes activos, p. ej., un compuesto (es decir, un compuesto de ciclohexenona descrito en la presente memoria) y un co-agente, se administran a un paciente como entidades separadas de forma simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo de intervención específicos, en donde dicha administración proporciona niveles

eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Lo último también se aplica a la terapia en cóctel, p. ej., la administración de tres o más ingredientes activos.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una mezcla de un compuesto (es decir, un compuesto de ciclohexenona descrito en la presente memoria) con otros componentes químicos, como vehículos, estabilizantes, diluyentes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. Existen múltiples técnicas de administración de un compuesto en la técnica que incluyen, pero no se limitan a: administración intravenosa, oral, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar y tópica.

El término “sujeto” o “paciente” abarca a los mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, cualquier miembro de la clase mamífero: seres humanos, primates no humanos como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja como terneras, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, como ratas, ratones y cobayas y similares. En una realización, el mamífero es un ser humano.

Los términos “tratar”, “que trata” o “tratamiento”, como se usan en la presente memoria, incluyen aliviar, calmar o mejorar al menos un síntoma de una enfermedad o condición, prevenir síntomas adicionales, inhibir la enfermedad o condición, p. ej., detener el desarrollo de la enfermedad o condición, aliviar la enfermedad o condición, provocar la regresión de la enfermedad o condición, aliviar una condición provocada por la enfermedad o condición, o parar los síntomas de la enfermedad o condición profilácticamente y/o terapéuticamente.

Rutas de administración y dosificación

Las rutas adecuadas de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral, intravenosa, rectal, en aerosol, parenteral, oftálmica, pulmonar, transmucosa, transdérmica, vaginal, ótica, nasal y tópica. Además, por medio de ejemplo solo, la administración parenteral incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, además de inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intralinfáticas e intranasales.

En ciertas realizaciones, un compuesto como se describe en la presente memoria se administra de una manera local más que sistémica, por ejemplo, por medio de inyección del compuesto directamente en un órgano, a menudo en un preparado de depósito o formulación de liberación sostenida. En realizaciones específicas, las formulaciones de acción prolongada se administran por implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Además, en otras realizaciones, el fármaco se administra en un sistema de distribución de fármacos objetivo, por ejemplo, en un liposoma recubierto con anticuerpo específico del órgano. En dichas realizaciones, los liposomas se dirigen a y se absorben selectivamente por el órgano. En aún otras realizaciones, el compuesto como se describe en la presente memoria se proporciona en forma de una formulación de liberación rápida, en forma de una formulación de liberación extendida, o en forma de una formulación de liberación intermedia. En aún otras realizaciones, el compuesto descrito en la presente memoria se administra tópicamente.

En algunas realizaciones, el compuesto de ciclohexenona se administra parenteralmente o intravenosamente. En otras realizaciones, el compuesto de ciclohexenona se administra por inyección. En algunas realizaciones, el compuesto de ciclohexenona se administra oralmente.

En el caso en donde la condición del paciente no mejora, a la discreción del doctor la administración de los compuestos pueden administrarse crónicamente, es decir, durante un extenso periodo de tiempo, que incluye, durante toda la duración de la vida del paciente para mejorar o controlar de otra forma o limitar los síntomas de la enfermedad o condición del paciente. En el caso en donde el estado del paciente mejora, a la discreción del doctor la administración de los compuestos puede darse de forma continua o suspendido temporalmente durante una cierta longitud del tiempo (es decir, unas “vacaciones de fármaco”).

Los intervalos anteriores son meramente sugestivos, ya que el número de variables con respecto a un régimen de tratamiento individual es grande, y no son raras las considerables excursiones a partir de estos valores recomendados. Dichas dosificaciones pueden alterarse dependiendo de un número de variables, no limitadas a la actividad del compuesto usado, la enfermedad o condición a tratar, el modo de administración, las necesidades del sujeto individual, la gravedad de la enfermedad o condición a tratar, y el juicio del profesional médico.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos regímenes terapéuticos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, que incluyen, pero no se limitan a, la determinación de la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y las DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre DL_{50} y DE_{50} . Se prefieren los compuestos que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para usar en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con mínima toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria se formulan en composiciones farmacéuticas. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas se formulan de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración elegida. Cualquier técnica, vehículo y excipiente farmacéuticamente aceptable se usa como adecuado para formular las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, decimonovena edición (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1975; Liberman, H.A. y Lachman L. Eds. "Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, séptima Ed. (Lippincott Williams y Wilkins 1999).

Se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos definidos en las reivindicaciones y un(os) diluyente(s), excipiente(s) o vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s). Los compuestos como se definen en las reivindicaciones se administran como composiciones farmacéuticas en que el compuesto de ciclohexenona se mezcla con otros ingredientes activos como se define en las reivindicaciones, como una terapia de combinación.

Una composición farmacéutica, como se usa en la presente invención, se refiere a una mezcla de los compuestos definidos en las reivindicaciones con otros componentes químicos, como vehículos, estabilizantes, diluyentes, agentes de dispersión, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. Según la invención, las cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos se administran en una composición farmacéutica a un mamífero que tiene la enfermedad o condición a tratar como se define en las reivindicaciones. En realizaciones específicas, el mamífero es un ser humano. En ciertas realizaciones, las cantidades terapéuticamente eficaces varían dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado y otros factores. Los compuestos descritos en las reivindicaciones pueden usarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos como componentes de mezclas.

En una realización, la composición definida en las reivindicaciones se formula en una disolución acuosa. En realizaciones específicas, la disolución acuosa se selecciona de, por medio de ejemplo solo, un tampón fisiológicamente compatible, como una disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. En otras realizaciones, la composición definida en las reivindicaciones se formula para la administración transmucosa. En realizaciones específicas, las formulaciones transmucosas incluyen penetrantes que son apropiados para permearse por la barrera. En aún otras realizaciones en donde la composición definida en las reivindicaciones se formulan para otras inyecciones parenterales, las formulaciones apropiadas incluyen disoluciones acuosas o no acuosas. En realizaciones específicas, dichas disoluciones incluyen tampones y/o excipientes fisiológicamente compatibles.

En otra realización, las composiciones definidas en las reivindicaciones se formulan para administración oral. La composición definida en las reivindicaciones se formulan combinando los compuestos activos con, p. ej., vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En diversas realizaciones, la composición definida en las reivindicaciones se formulan en formas de dosificación oral que incluyen, por medio de ejemplo solo, comprimidos, polvos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, elixires, suspensiones finas, suspensiones y similares.

En ciertas realizaciones, los preparados farmacéuticos para uso oral se obtienen mezclando uno o más excipientes sólidos con los compuestos de la composición definida en las reivindicaciones, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, añadiendo después auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparados de celulosa como: por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica; u otros como: polivinilpirrolidona (PVP o povidona) o fosfato de calcio. En realizaciones específicas, se añaden opcionalmente agentes desintegrantes. Los agentes desintegrantes incluyen, por medio solo de ejemplo, croscarmelosa sódica reticulada, polivinilpirrolidona, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos como alginato sódico.

En una realización, las formas de dosificación, como núcleos de grageas y comprimidos, se proporcionan con uno o más recubrimientos adecuados. En realizaciones específicas, las disoluciones de azúcar concentradas se usan para recubrir la forma de dosificación. Las disoluciones de azúcar, opcionalmente contienen componentes adicionales, como por medio solo de ejemplo, goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de lacas y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Los tintes y/o pigmentos también se añaden opcionalmente a los recubrimientos para propósitos de identificación. Adicionalmente, los tintes y/o pigmentos se utilizan opcionalmente para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

En ciertas realizaciones, cantidades terapéuticamente eficaces de la composición definida en las reivindicaciones se formulan en otras formas de dosificación oral. Las formas de dosificaciones orales incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, además de cápsulas selladas blanda hechas de gelatina y plastificante, como glicerol o sorbitol. En

realizaciones específicas las cápsulas duras contienen los ingredientes activos en mezcla con una o más cargas. Las cargas incluyen, por medio de ejemplo solo, lactosa, ligantes como almidones y/o lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En otras realizaciones, las cápsulas blandas, contienen uno o más compuestos activos que se disuelven o suspenden en un líquido adecuado. Los líquidos adecuados incluyen, por medio de ejemplo solo, uno o más de aceite graso, parafina líquida, o polietilenglicol líquido. Además, se añaden opcionalmente estabilizantes.

En otras realizaciones, las cantidades terapéuticamente eficaces de la composición definida en las reivindicaciones en la presente memoria se formulan para administración bucal o sublingual. Las formulaciones adecuadas para la administración bucal o sublingual incluyen, por medio de ejemplo solo, comprimidos, pastillas para chupar o geles. En aún otras realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria se formulan para inyección parenteral, que incluyen formulaciones adecuadas para inyección en bolo o infusión continua. En realizaciones específicas, las formulaciones para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria (p. ej., en ampollas) o en recipientes multidosis. Los conservantes se añaden, opcionalmente, a las formulaciones de inyección. En aún otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas definidas en las reivindicaciones se formulan en una forma adecuada para la inyección parenteral como unas suspensiones, disoluciones o emulsiones estériles en vehículos oleosos o acuosos. Las formulaciones para inyección parenteral contienen opcionalmente agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes y/o agentes de dispersión. En realizaciones específicas, las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. En realizaciones adicionales, las suspensiones de los compuestos activos se preparan como suspensiones de inyección oleosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados para el uso en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen, por medio de ejemplo solo, aceites grasos como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. En ciertas realizaciones específicas, las suspensiones de inyección acuosa contienen sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión contiene estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas. Alternativamente, en otras realizaciones, el ingrediente activo está en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógeno, antes de usar.

En un aspecto, las composiciones definidas en las reivindicaciones se preparan como disoluciones para la inyección parenteral como se describe en la presente memoria o se conoce en la técnica y se administran con un inyector automático. Se conocen los inyectores automáticos, como los descritos en las patentes de EE.UU. núms. 4,031,893, 5,358,489; 5,540,664; 5,665,071; 5,695,472 y la patente internacional WO/2005/087297. En general, todos los inyectores automáticos contienen un volumen de disolución que incluye la composición definida en las reivindicaciones a inyectar. En general, los inyectores automáticos incluyen un depósito para contener la disolución, que está en comunicación fluida con una aguja para la administración del fármaco, además de un mecanismo para utilizar automáticamente la aguja, insertando la aguja en el paciente y distribuyendo la dosis en el paciente. Los inyectores ejemplares proporcionan aproximadamente 0,3 mL, 0,6 mL, 1,0 mL u otro volumen adecuado de disolución a aproximadamente una concentración de 0,5 mg a 50 mg del compuesto de ciclohexenona definido en las reivindicaciones por 1 mL de disolución. Cada inyector es capaz de distribuir solo una dosis del compuesto.

En aún otras reivindicaciones, las composiciones definidas en las reivindicaciones se administran tópicamente. Las composiciones definidas en las reivindicaciones descritas en la presente memoria se formulan en una variedad de composiciones administrables tópicamente, como disoluciones, suspensiones, lociones, geles, pastas, barras medicadas, bálsamos, cremas o pomadas. Dichas composiciones farmacéuticas contienen opcionalmente solubilizantes, estabilizantes, agentes potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

En aún otras realizaciones, las composiciones definidas en las reivindicaciones se formulan en composiciones rectales como enemas, geles rectales, espumas rectales, aerosoles rectales, supositorios, supositorios gelatinosos, o enemas de retención, que contienen bases convencionales de supositorios como manteca de cacao u otros glicéridos, además de polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona, PEG, y similares. En las formas de supositorio de las composiciones, se funde primero una cera de bajo punto de fusión como, pero no limitada a, una mezcla de glicéridos de ácido graso, opcionalmente en combinación con manteca de cacao.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan en cualquier manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesado de los compuestos activos en preparados que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada es dependiente de la ruta de administración elegida. Cualquier técnica, vehículo y excipiente farmacéuticamente aceptable se usa opcionalmente como adecuado y como se entiende en la técnica. Las composiciones farmacéuticas como se definen en las reivindicaciones pueden fabricarse de una manera convencional, como, por medio de ejemplo solo, por medio de procesos de mezcla, disolución, granulado, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulado, atrapamiento o compresión convencionales.

Las composiciones farmacéuticas incluyen al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y la composición definida en las reivindicaciones. El ingrediente activo está en forma de ácido libre o base libre, o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable. Además, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen el uso de formas cristalinas (también conocidas como polimorfos) de estos compuestos que tienen

el mismo tipo de actividad. Adicionalmente, los compuestos descritos en la presente memoria abarcan formas no solvatadas además de formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Las formas solvatadas de los compuestos presentados en la presente memoria también se considera que están descritas en la presente memoria. Además, las composiciones farmacéuticas incluyen opcionalmente otros agentes medicinales o farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulgentes, promotores de la disolución, sales para regular la presión osmótica, tampones y/u otras sustancias terapéuticamente valiosas.

Los métodos para la preparación de composiciones que comprenden los compuestos descritos en la presente memoria incluyen formular los compuestos con uno o más excipientes o vehículos inertes, farmacéuticamente aceptables, para formar un sólido, semisólido o líquido. Las composiciones sólidas incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, obleas y supositorios. Las composiciones líquidas incluyen disoluciones en que se disuelve un compuesto, emulsiones que comprenden un compuesto, o una disolución que contiene liposomas, micelas o nanopartículas que comprenden un compuesto como se describe en la presente memoria. Las composiciones semisólidas incluyen, pero no se limitan a, geles, suspensiones y cremas. La forma de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluye disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en un líquido antes del uso, o como emulsiones. Estas composiciones también contienen opcionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulgentes, agentes tamponantes del pH, etcétera.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones toma de forma ilustrativa la forma de un líquido donde los agentes están presentes en disolución, en suspensión o ambas. Típicamente cuando la composición se administra como una disolución o suspensión una primera parte del agente está presente en disolución y una segunda parte del agente está presente en forma de partículas, en suspensión en una matriz líquida. En algunas realizaciones, una composición líquida incluye una formulación en gel. En otras realizaciones, la composición líquida es acuosa.

En ciertas realizaciones, las suspensiones acuosas farmacéuticas incluyen uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros incluyen polímeros solubles en agua como polímeros celulósicos, p. ej., hidroxipropilmetilcelulosa, y polímeros insolubles en agua como polímeros que contienen carboxilo reticulados. Ciertas composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria incluyen un polímero mucoadhesivo, seleccionado de, por ejemplo, carboximetilcelulosa, carbómero (polímero de ácido acrílico), poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida, policarbófilo, copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato sódico y dextrano.

Las composiciones farmacéuticas además, incluyen opcionalmente agentes solubilizantes para ayudar en la solubilidad del compuesto de ciclohexenona definido en las reivindicaciones. El término "agente solubilizante" generalmente incluye agentes que dan por resultado la formación de una disolución micelar o una disolución real del agente. Ciertos tensioactivos no iónicos aceptables, por ejemplo polisorbato 80, son útiles como agentes solubilizantes, como pueden ser glicoles oftálmicamente aceptables, poliglicoles, p. ej., polietilenglicol 400, y éteres glicólicos.

Además, las composiciones farmacéuticas incluyen opcionalmente uno o más agentes de ajuste de pH o agentes tamponantes, que incluyen ácidos como ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases como hidróxido sódico, fosfato sódico, borato sódico, citrato sódico, acetato sódico, lactato sódico y tris-hidroximetilaminometano; y tampones como citrato/dextrosa, bicarbonato sódico y cloruro de amonio. Dichos ácidos, bases y tampones se incluyen en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un intervalo aceptable.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas incluyen opcionalmente una o más sales en una cantidad necesaria para llevar la osmolalidad de la composición a un intervalo aceptable. Dichas sales incluyen aquellas que tienen cationes sodio, potasio o amonio y aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito; las sales adecuadas incluyen cloruro sódico, cloruro potásico, tiosulfato sódico, bisulfito sódico y sulfato de amonio.

Otras composiciones farmacéuticas incluyen opcionalmente uno o más conservantes para inhibir la actividad microbiana. Los conservantes adecuados incluyen sustancias que contienen mercurio como merfeno y tiomersal; dióxido de cloro estabilizado; y compuestos de amonio cuaternario como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio.

Aún otras composiciones farmacéuticas incluyen uno o más tensioactivos para potenciar la estabilidad física o para otros fines. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen glicéridos de ácidos grasos de polioxietileno y aceites vegetales, p. ej., aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno (60); y éteres de alquilo y éteres de alquilfenilo de polioxietileno, p. ej., octoxinol 10, octoxinol 40.

Aún otras composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más antioxidantes para potenciar la estabilidad química cuando se necesite. Los antioxidantes adecuados incluyen, por medio de ejemplo solo, ácido ascórbico y metabisulfito sódico.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas en suspensión acuosa están empaquetadas en recipientes de dosis única que no pueden volverse a cerrar. Alternativamente, se usan recipientes multidosis que pueden volver a cerrarse, en cuyo caso es típico incluir un conservante en la composición.

En realizaciones alternativas, se emplean otros sistemas de administración para compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y emulsiones son ejemplos de vehículos o transportes de administración en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los disolventes orgánicos como N-metilpirrolidona también se emplean. En realizaciones adicionales, los compuestos descritos en la presente memoria se administran usando un sistema de liberación sostenida, como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Diversos materiales de liberación sostenida son útiles en la presente memoria. En algunas realizaciones, las cápsulas de liberación sostenida liberan los compuestos durante unas pocas horas hasta más de 24 horas. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

En ciertas realizaciones, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen uno o más antioxidantes, agentes quelantes metálicos, compuestos que contienen tiol y/u otros agentes estabilizantes generales. Ejemplos de dichos agentes estabilizantes, incluyen, pero no se limitan a: (a) aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2% en p/v de glicerol, (b) aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% en p/v de metionina, (c) aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2% en p/v de monotioglicerol, (d) aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM de EDTA, (e) aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2% en p/v de ácido ascórbico, (f) 0,003% a aproximadamente 0,02% en p/v de polisorbato 80, (g) 0,001% a aproximadamente 0,05% en p/v de polisorbato 20, (h) arginina, (i) heparina, (j) sulfato de dextrano, (k) ciclodextrinas, (l) polisulfato de pentosano y otros heparinoides, (m) cationes divalentes como magnesio y zinc, o (n) combinaciones de los mismos.

Consideración general para tratamientos de combinación

En general, las composiciones descritas en la presente memoria y, en realizaciones donde la terapia de combinación se emplea y se describe en la presente memoria, otros agentes no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica, y en algunas realizaciones, debido a diferentes características físicas y químicas, se administran por rutas diferentes. En algunas realizaciones, la administración inicial se hace según los protocolos establecidos, y después, en base a los efectos observados, la dosificación, modos de administración y tiempos de administración se modifica por el médico experto.

En algunas realizaciones, las dosificaciones terapéuticamente eficaces varían cuando los fármacos se usan en combinaciones de tratamiento. El tratamiento de combinación incluye además tratamientos periódicos que comienzan y paran en varios momentos para ayudar con la gestión clínica del paciente. Para terapias de combinación descritas en la presente memoria, las dosificaciones de los compuestos co-administrados varían dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, en el fármaco específico empleado, en la enfermedad, trastorno o condición a tratar, etcétera.

Se entiende que en algunas realizaciones, el régimen de dosificación para tratar, prevenir o mejorar la(s) condición(ones) para la(s) que se busca alivio, se modifica de acuerdo con una variedad de factores. Estos factores incluyen el trastorno por el que sufre el sujeto, además de la edad, peso, sexo, dieta y condición médica del sujeto. Por consiguiente, en otras realizaciones, el régimen de dosificación empleado en realidad varía ampliamente y por lo tanto se desvía de los regímenes de dosificación descritos en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de los compuestos de ciclohexenona ejemplares

Por medio de un procedimiento de purificación herbal particular: el siguiente procedimiento es solo con propósito ilustrativo. Los demás métodos de purificación pueden usarse también.

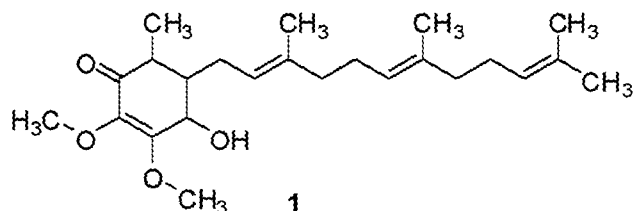
Cien gramos de micelios, cuerpos fructíferos o mezcla de ambos de *Antrodia camphorata* se pusieron en un matraz. Se añadió una cantidad apropiada de agua y alcohol (70-100% de disolución de alcohol) en el matraz y se agitaron a 20-25 °C durante al menos 1 hora. La disolución se filtró a través de un filtro y se recogieron 0,45 µm de membrana y filtrado como un extracto.

El filtrado de *Antrodia camphorata* se sometió a análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La separación se realizó en una columna RP18, la fase móvil consistió en metanol (A) y 0,3% de ácido acético (B), con las condiciones de gradiente de 0-10 min en 95% - 20% de B, 10-20 min en 20% - 10% de B, 20-35 min en 10% - 10% de B, 35-40 min en 10% - 95% de B, al caudal de 1 ml/min. El efluente en columna se monitorizó con un detector de UV-visible.

Las fracciones recogidas a los 25 a 30 min se recogieron y se concentraron para proporcionar 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona (compuesto 1), un producto de líquido marrón amarillento claro. El análisis del compuesto 1 mostró la fórmula molecular de C₂₄H₃₈O₄, peso molecular de 390 con punto de fusión de 48 a 52 °C. Los espectros de RMN mostraron que ¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm) = 1,51, 1,67, 1,71, 1,75, 1,94, 2,03, 2,07, 2,22, 2,25, 3,68, 4,05, 5,07 y 5,14. ¹³C-RMN (CDCl₃) δ (ppm) = 12,31, 16,1, 16,12, 17,67, 25,67,

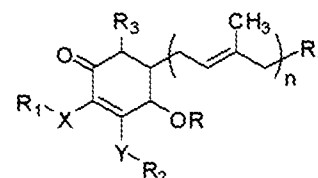
26,44, 26,74, 27,00, 39,71, 39,81, 40,27, 43,34, 59,22, 60,59, 120,97, 123,84, 124,30, 131,32, 135,35, 135,92, 138,05, 160,45 y 197,12.

Compuesto 1: 4-hidroxi-2,3-dimetoxi-6-metil-5-(3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)ciclohex-2-enona



- 5 Otros componentes donde R_4 es H, alquilo C_1-C_8 , alquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , o arilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo C_1-C_8 , alquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , cicloalquilo C_3-C_8 y haloalquilo C_1-C_8 se obtuvieron también.

De forma alternativa, los compuestos ejemplares pueden prepararse sintéticamente. Véase por ejemplo, la patente de EE.UU. núm. 9365481.



- 10 De forma similar, otros compuestos de ciclohexenona que tienen la estructura se aíslan de *Antrodia camphorata* o se preparan sintéticamente o semisintéticamente a partir de los materiales de partida adecuados. Un experto en la técnica utilizaría fácilmente las condiciones apropiadas para dicha síntesis.

- 15 Ejemplo 2. Estudio del compuesto 1 con fármacos de quimioterapia clínica en carcinoma pancreático humano en un sistema de cultivo de células AsPC-1 y en un modelo de tumor de xenoinjerto en ratón inmunodeficiente combinado severo

Para evaluar la eficacia de una terapia de combinación que comprende el compuesto 1 ejemplar con un agente anticancerígeno (p. ej., cualquier fármaco usado clínicamente) para el tratamiento del desarrollo de carcinoma pancreático, se realizó un estudio *in vitro* y un estudio de xenoinjertos *in vivo* mediante un compuesto 1 ejemplar con fármacos de quimioterapia clínica actuales seleccionados.

- 20 Para el estudio *in vitro*, el compuesto 1 y cada uno de los seis (6) fármacos de quimioterapia clínica seleccionados se usaron en carcinoma pancreático humano de AsPC-1 y/o CaPan-2, PANC-1 en un sistema de cultivo celular.

En el modelo de ratón con xenoinjerto *in vivo*, se seleccionaron gemcitabina y/o paclitaxel para ser administrados por medio de la vena de la cola dos veces a la semana con una administración oral del compuesto 1 una vez al día durante un total de 28 dosis en el modelo de xenoinjerto de AsPC-1 de carcinoma pancreático humano.

- 25 Prueba *in vitro*:

Las líneas celulares de carcinoma pancreático humano, AsPC-1, PANC-1 y CaPan-2 se sembraron en 3×10^4 células por pocillo y se cultivaron en una placa de cultivo celular de cuarenta y ocho (48) pocillos (área de crecimiento de $0,95 \text{ cm}^2$ por pocillo). Dieciséis (16) horas después, las células se trataron con compuesto 1 solo o compuesto 1 con un fármaco de quimioterapia clínica, respectivamente. Después de 48 o 72 horas del tratamiento, se realizó un ensayo de metiltiazoltetrazolio (MTT) (protocolo complementario-1) para medir el efecto del tratamiento en la viabilidad de las células durante la proliferación.

Prueba *in vivo*:

- 35 La línea celular de carcinoma pancreático humano, AsPC-1, se cultivó y las células se inyectaron subcutáneamente en un flanco de 60 ratones. Tres días después, los tumores pudieron sentirse en los ratones. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente $100-200 \text{ mg (mm}^3\text{)}$, se seleccionaron aleatoriamente un total de cincuenta y un (51) ratones que portaban un tumor y se clasificaron de uno a seis (6) grupos. Se usaron ratones tratados con vehículo (aceite de maíz) como controles negativos. El compuesto 1 combinado con gemcitabina o paclitaxel se administró oralmente una vez al día y/o i.v. dos veces a la semana durante cuatro (4) semanas. Las medidas de los tumores se grabaron una vez a la semana usando calibradores portátiles y el sistema de imagen Visualsonic Vevo 2100. Se tomaron los pesos de los ratones individuales una vez al mes durante la dosificación. Los ratones se monitorizaron diariamente por signos de toxicidad y morbilidad; cualquier descubrimiento anormal se grabó. El estudio se terminó cuatro (4) semanas después del inicio de la administración del fármaco.

Se hizo la eutanasia a los ratones cuando un ratón individual tiene un tumor que es de 2.000 mg (cm³) durante una (1) medida. Un ratón estaba moribundo cuando un tumor impide la capacidad del ratón para alimentarse, beber o deambular, o si un ratón pierde >20% de su peso corporal original. Se hizo la eutanasia a un grupo individual cuando los tumores alcanzaron un tamaño objetivo medio de 1.500 mg por grupo durante dos (2) medidas consecutivas. Los coordinadores del estudio debían ser notificados de cualquier eutanasia no programada. El estudio se terminó cuatro (4) semanas después del inicio de la administración de los fármacos.

Sistema de prueba:

A. Líneas celulares:

Carcinoma pancreático humano de AsPC-1 (núm. del catálogo ATCC CRL-1682).

10 Carcinoma pancreático humano de PANC-1 (núm. del catálogo ATCC CRL-1469).

Carcinoma pancreático humano de CaPan-2 (núm. del catálogo ATCC HTB-80).

B. Preparación celular

1. Eliminar y descartar el medio de cultivo.

2. Enjuagar brevemente la capa de células con 5 mL de HBSS. Agitar suavemente y eliminar el HBSS.

15 3. Añadir 5 mL de tripsina-EDTA a placas de poliestireno de 15 cm². Incubar 5 min a 37 °C en una incubadora humidificada con atmósfera de 95% de aire/5% de CO₂.

4. Añadir 5 mL de medio de crecimiento completo (medio DMEM que contiene 10% de FBS) y aspirar las células mediante pipeteado suave.

20 5. Contar las células vivas usando el ensayo de exclusión de azul de tripano (protocolo complementario-2) con un hemocitómetro.

6. Para el estudio *in vitro*, las células se sembrarán en 3 x 10⁴ células por pocillo y se cultivarán en una placa de cultivo celular de cuarenta y ocho (48) pocillos durante dieciséis (16) horas hasta el tratamiento.

7. Incubar los cultivos a 37 °C.

C. Especie/cepa animal:

25 a. Ratones desnudos, BALB/cAnN.Cg-*Foxn1*^{nu}/CrI Nar1

b. Ratones desnudos atímicos, hembras (nu/nu) de 4-6 semanas de edad.

c. Peso corporal: entre 15 y 20 g en el día de inoculación de las células tumorales.

D. Modelos de xenoinjerto de carcinoma pancreático humano:

30 1. Para crear el modelo de xenoinjerto subcutáneo, se inocularon ratones desnudos atímicos hembra (4-6 semanas de edad) subcutáneamente con 1 x 10⁷ células AsPC-1 en 0,1 mL de medio DMEM libre de suero que contenía 20% de Matrigel (BD Biosciences, Bedford MA).

2. Los animales que portaban un tumor se dividieron en los siguientes 6 grupos como en la tabla 1.

35 3. Los ratones se monitorizaron por la actividad y condición física cada día, y la determinación del peso corporal y la medida de la masa tumoral debía hacerse una vez a la semana. La imagen del tumor se fotografiará mediante una cámara digital y el sistema de imagen Visualsonic Vevo 2100. La masa tumoral se determina mediante la medida del calibrador en dos diámetros perpendiculares del implante y se calculan usando la fórmula $(4/3) \times (\pi \times a \times b^2)$, donde "a" significa el diámetro largo y "b" es el diámetro corto.

E. Artículos de la prueba:

Los fármacos de quimioterapia clínica se compraron a Sigma-Aldrich Co. LLC, y se prepararon de la siguiente manera:

40 - Erlotinib (concentración de las existencias 100 mM en DMSO, Catálogo Sigma núm. E4997).

- 5-Fluorouracilo (concentración de las existencias 100 mM, catálogo Sigma núm. F6627).

- Gemcitabina (concentración de las existencias 100 mM en DMSO, catálogo Sigma núm. G6423).

- Irinotecano (concentración de las existencias 100 mM en DMSO, catálogo Sigma núm. I1406).

- Oxaliplatina (concentración de las existencias 50 mM en DMSO, catálogo Sigma núm. O9512).

- Paclitaxel (concentración de las existencias 10 mM en DMSO, catálogo Sigma núm. T7402).

Para la prueba *in vivo*, se compró gemcitabina (G) a Eli Lilly (Indianápolis, IN, EE.UU.), y paclitaxel (P) se compró a Sigma-Aldrich.

5 F. Diseño del experimento *in vitro*:

10 a. Citotoxicidad de los artículos de la prueba (TC_{50}): se sembraron 3×10^4 células de AsPC-1 (contadas por el contador de células, contador de células automatizado o hemocitómetro LUNA™) por pocillo y se cultivaron en una placa de cultivo celular de 48 pocillos. Las células se trataron con un único artículo de 400 u 800 μ M con dilución en serie a 0 μ M. Después de 48 o 72 horas de tratarse, el ensayo MTT se realizó para medir el efecto del tratamiento en la viabilidad de las células AsPC-1 durante la proliferación. La absorbancia a 595 nm se midió usando un lector de microplaca (BioTEK, Synergy™ H1). Las curvas de sensibilidad del artículo y los valores de TC_{50} se calcularon usando el software GraphPad Prism 4.0.

15 b. Terapia de combinación del compuesto 1 y fármacos de quimioterapia: Este estudio también contiene la citotoxicidad del compuesto 1 más un fármaco de quimioterapia de selecciones para investigar la eficacia de dicha combinación. El compuesto 1 combinado con cada uno de paclitaxel, gemcitabina, 5-FU, oxaliplatina, erlotinib e irinotecano, respectivamente. Después de tratarse 72 horas, el ensayo de MTT se realizó para medir el efecto del tratamiento de la viabilidad de las células AsPC-1 durante la proliferación. La absorbancia a 595 nm se midió usando un lector de microplaca.

20 c. Evaluación de las interacciones de los fármacos: el ensayo de MTT se realizó también para probar el efecto de las combinaciones de fármacos en la viabilidad de las líneas celulares AsPC-1, PANC-1 y CaPan-2. El método del isoblograma del índice de combinación (IC) de Chou y Talalay (Chou, T. C.; Talalay P. "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors", *Advances in enzyme regulation*, 1984, 22, 27-55; Chang T. T.; Chou, T. C. "Rational approach to the clinical protocol design for drug combinations: a review", *Acta paediatrica Taiwanica = Taiwan er ke yi xue hui za zhi*, 2000, 41, 294-302) que se basa en el principio del efecto mediano, se usó para calcular el sinergismo o antagonismo para los efectos de los fármacos combinados. Las curvas del efecto con la dosis para cada fármaco, separadamente y en combinación, en concentraciones diluidas en serie se representaron usando la ecuación del efecto mediano y la gráfica (Chou, T. C. "The median effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism" en *Synergism and antagonism in chemotherapy* (eds.: T. C. Chou y D. C. Rideout), Academic Press, San Diego, 1991, págs. 61-102) y la ecuación de IC y la gráfica (Chou T. C.; Motzer, R. J.; Tong, Y.; Bosl, G. J. "Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design", *Journal of the National Cancer Institute*, 1994, 86, 1517-1524). Los valores de IC a diferentes niveles de efecto y dosis y los isoblogramas se generaron automáticamente usando el software informático CompuSyn (Chou, T. C.; Martin, N. *CompuSyn for Drug Combinations*, Combosyn, Inc., Apartado de correos 1277, Paramus, NJ, 2005). Con este método, los efectos aditivo, sinérgico o antagónico, se indican mediante los valores de IC de 1, <1 y >1, respectivamente.

G. Diseño del experimento *in vivo*:

40 a. Inyecciones de células: los ratones se inyectaron subcutáneamente en el tórax lateral derecho con 1×10^7 células AsPC-1 de carcinoma pancreático humano viables. Un total de 60 ratones se inyectaron, con aproximadamente 36 ratones que portaban tumores que se usaron en este estudio.

45 b. Selecciones de animales y asignación de grupo: Este estudio contenía seis (6) grupos y cada grupo incluía ocho (8) o nueve (9) ratones respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de la ventana de objetivos de aproximadamente 100-200 mg (mm^3), se seleccionaron aleatoriamente 54 ratones que portaban tumores y se clasificaron en uno de 6 grupos. El grupo 1 es un control negativo tratado con disolvente y contenía ratones que recibieron el tratamiento-1. Los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 contenían ratones que recibieron tratamiento-2, tratamiento-3, tratamiento-4, tratamiento-5 y tratamiento-6, respectivamente. La tabla 1 enumera concentraciones de artículos de prueba, artículos de disolvente y horarios de dosificación.

c. Preparación de la dosis:

c-1: Compuesto 1 (A)

50 i. Se pesó una cantidad apropiada de compuesto 1 y se añadió en un tubo de 50 mL.

ii. Se añadió una cantidad apropiada de aceite de maíz (Sigma-Aldrich) en el tubo de 50 mL. Se mezcló la formulación con vórtice hasta que se homogeneizó completamente. Se sacó la formulación a una jeringa desechable y se transfirió a tubos marrones de 4 mL, 3,2 mL/tubo.

iii. Se almacenó la suspensión en condiciones de congelación (-20 °C) hasta que se usó.

iv. Se descongeló totalmente la formulación en un baño de agua a 37 °C el día previsto de uso.

c-2: Gemcitabina (G)

i. Se almacenaron las existencias de gemcitabina como una disolución de 50 mg/mL en PBS estéril a -20 °C (Ito, D. et al., "In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer", International journal of cancer 2006, 118, 2337-2343; Awasthi, N. et al. "Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer", Carcinogenesis, 2013, 34, 2361-2369).

ii. Antes de los estudios en animales, se pesó una cantidad apropiada de gemcitabina en un tubo de 4 mL.

iii. Se añadió un volumen apropiado de vehículo-I (50% de etanol y 50% de Tween-80 (v/p)) en el tubo de 4 mL y se agitó hasta que el material se disolvió completamente.

iv. Se añadió un volumen apropiado de solución salina fisiológica en el tubo de 4 mL y se movió el tubo de lado a lado hasta homogeneizar completamente la disolución.

c-3 Paclitaxel (P)

i. Se disolvieron las existencias de paclitaxel en etanol al 100% a una concentración final de 10 mg/mL (Shi, B. et al., "The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 synergizes with taxanes *in vitro* and enhances their antitumor activity *in vivo*", Cancer chemotherapy and pharmacology, 2000, 46, 387-393; Chang, C. C. et al., "Reversal of multidrug resistance by two nordihydroguaiaretic acid derivatives, M4N and maltose-M3N, and their use in combination with doxorubicin or paclitaxel", Cancer chemotherapy and pharmacology, 2006, 58, 640-653; Awasthi, N. et al. "Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer", Carcinogenesis, 2013, 34, 2361-2369).

ii. Antes de los estudios en animales, se pesó una cantidad apropiada de paclitaxel en un tubo de 4 mL.

iii. Se añadió un volumen apropiado de vehículo-I^b en el tubo de 4 mL y se agitó hasta que el material se disolvió completamente.

iv. Se añadió un volumen apropiado de solución salina fisiológica en el tubo de 4 mL y se movió el tubo de lado a lado hasta homogeneizar completamente la disolución.

Tabla 1: Grupos de tratamiento del xenoinjerto de AsPC-1:

Número de grupo	Etiqueta de tratamiento	Dosis/ratón/día o tiempo	Ruta de dosificación	Volumen de dosis / ratón	Frecuencia
1	Tratamiento-1	Disolvente (aceite de maíz)	Oral	100 µL para oral, 20 – 30 uL para I.V.	Oralmente una vez al día, I.V. dos veces a la semana durante 4 semanas
2	Tratamiento-2	A (120 mg/kg)	Oral (A)		
3	Tratamiento-3	A (120 mg/kg) G (100 mg/kg)	Oral (A) / IV (G)		
4	Tratamiento-4	A (120 mg/kg) P (5 mg/kg)	Oral (A) / IV (P)		
5	Tratamiento-5	G (100 mg/kg) P (5 mg/kg)	IV (G y P)		
6	Tratamiento-6	G (10 mg/kg) P (30 mg) A (120 mg/kg)	Oral (A) IV (G y P)		

Observaciones y exámenes del sistema *in vivo*:

A. Observaciones clínicas: se realizaron observaciones clínicas de cada animal de estudio y al menos una vez al día (incluyendo fines de semana y fiestas) por señales de morbilidad, mortalidad y toxicidad del artículo de prueba. La

morbilidad incluye señales de enfermedad como tal, pero no se limita a, demacración, deshidratación, letargia, postura encorvada, apariencia descuidada, disnea y manchado de orina o fecal. Todos los descubrimientos anormales se grabarán.

5 B. Pesos de los animales: los pesos de los animales individuales se tomaron una (1) vez por semana después/antes de la dosificación. Los pesos se grabaron primero antes de las inyecciones celulares y se continuaron durante la duración del estudio.

10 C. Medidas tumorales: el sitio de inyección de cada animal se monitorizó una (1) vez por semana por señales del crecimiento tumoral. A lo largo del estudio, la longitud (a) y la anchura (b) de cualquier tumor desarrollado se midió en milímetros (mm) usando pies de rey, donde a es la más larga de las dos (2) dimensiones. El tamaño de tumor aplicable en milímetros (mm) o centímetros (cm) se calculó usando la fórmula asociada con un elipsoide prolato: $M = (4/3) \times (\pi \times a \times b^2)$; y estos datos se grabaron.

D. Evaluación del efecto sinérgico del fármaco mediante la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y relación inhibidora del tumor (TIR, por sus siglas en inglés): el volumen de la inhibición de crecimiento del tumor (TGI) para cada grupo se calculó según la siguiente fórmula:

15
$$\text{Inhibición de crecimiento tumoral (\%)} = (1 - [T - T_0] / [C - C_0]) \times 100$$

T y T_0 son los volúmenes tumorales medios en el último día y el día 1 de tratamiento, respectivamente, para los grupos experimentales. Para los grupos de control, C y C_0 son los volúmenes tumorales en el último día y el comienzo del estudio, respectivamente.

20 Para TIR, en la 4ª semana después del tratamiento, los ratones se sacrificaron, y los tumores se extirparon cuidadosamente y se pesaron después de lavar cualquier resto de sangre con PBS. La relación inhibidora tumoral se calculó por la fórmula:

$$\text{Relación inhibidora tumoral (\%)} = [W_{\text{control}} - W_{\text{tratado}}] / W_{\text{control}} \times 100\%$$

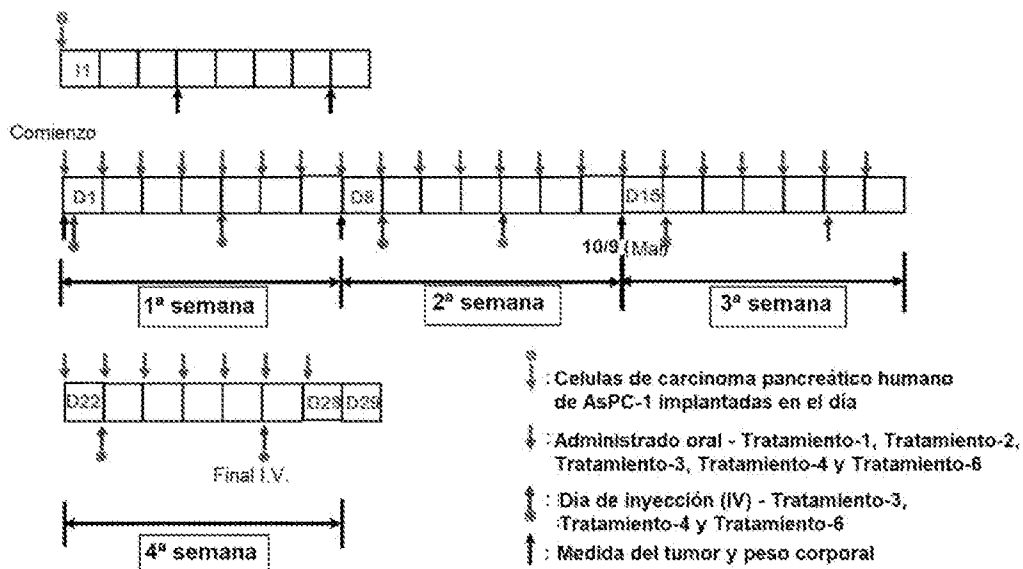
W_{tratado} y W_{control} son los pesos tumorales promedio de los ratones tratados y de control, respectivamente.

25 D. Parámetros hematológicos: se recogió sangre cardíaca en EDTA para analizar parámetros hematológicos como el recuento de células sanguíneas blancas (WBC), recuento de células sanguíneas rojas (RBC), concentración de hemoglobina (HB), hematocrito, hemoglobina corpuscular media y concentración, anchura de distribución de plaquetas, recuento de plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos. Esto se determinó usando recuento de hematología (Abbott Cell-Dyn 3700, IL).

30 Análisis estadístico: todos los datos se presentaron como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). El análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) se usó para determinar la significancia entre grupos. Para múltiples comparaciones de más de dos grupos, el análisis ANOVA se usó y fue seguido por pruebas a posteriori con la corrección de Bonferroni. Un valor de $p < 0,05$ se consideró que era significativo.

Ilustración del horario diario del estudio de xenoinjerto:

Horario de inyección de células de carcinoma pancreático humano de AsPC-1



Resultados:

Citotoxicidad *in vitro*: para evaluar la eficacia terapéutica combinatoria del compuesto 1 ejemplar, se midió la viabilidad de las líneas celulares AsPC-1 tratadas usando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Se investigó la concentración tóxica (CT₅₀) del compuesto 1 (es decir, antroquinonol) y fármacos de quimioterapia en la línea celular de AsPC-1. Las FIG. 1 a 7 y la tabla 2 muestran la citotoxicidad del compuesto 1 y fármacos de quimioterapia en la línea celular AsPC-1. Según estos resultados, se confirmó que el compuesto 1 y el tratamiento de combinación de fármacos de quimioterapia en la viabilidad celular de AsPC-1 seguido por concentración de fármaco en la tabla 3. Las células AsPC-1 se incubaron individualmente con el compuesto 1 o cada una de las combinaciones de fármacos durante 48 h y 72 h. En las FIG. 8 y 9, se midió la viabilidad de las células de AsPC-1 incubadas con el compuesto 1, los ensayos MTT de cada fármaco de quimioterapia y sus combinaciones durante 48 h y 72 h respectivamente. Las células de AsPC-1 tratadas con compuesto 1 o fármacos de quimioterapia solos mostraron un 75% a 80% de viabilidad del compuesto 1 con los fármacos de quimioterapia seleccionados que pueden tener un efecto sinérgico para controlar la viabilidad de células AsPC-1. Además, estos resultados también indicaron una combinación de los fármacos clínicos probados y el compuesto 1 tiene un efecto más extremo en células cancerígenas pancreáticas humanas de AsPC-1 que el correspondiente tratamiento de fármaco sencillo.

Tabla 2. Efecto de fármacos anticancerígenos en la citotoxicidad a 48 y 72 horas (antroquinonol = compuesto 1)

Fármaco	TC ₅₀ (μM) ^a	
	48 horas	72 horas
Antroquinonol	58,09	24,04
Erlotinib	>800	>800
5-FU	>800	>800
Gemcitabina	>800	>800
Irinotecano	221,3	68,34
Oxaliplatina	654,7	57,91
Paclitaxel	7,054	3,719

^aTC₅₀: la concentración del compuesto al que la viabilidad celular se redujo a 50%.

Se evaluaron las combinaciones de compuesto 1 con paclitaxel y/o gemcitabina, que tienen efecto sinérgico para cáncer de páncreas. Se usaron tres líneas celulares de cáncer de páncreas, AsPC-1, CaPan-2 y Panc-1 se usaron para probar las combinaciones a través del análisis de efecto mediano.

Tabla 3. Concentraciones de fármacos usados en las combinaciones en citotoxicidad de células AsPC-1.

Fármaco	Concentración (μM)	
	48 horas	72 horas
Antroquinonol (compuesto 1)	20	20
Erlotinib	100	100
5-FU	100	100
Gemcitabina	100	100
Irinotecano	200	70
Oxaliplatina	200	60
Paclitaxel	7	3

Evaluación del efecto de la terapia de combinación del compuesto 1 con fármacos quimioterapéuticos, gemcitabina y paclitaxel

El análisis del efecto mediano de Chou y Talalay (Chou, T. C.; Talalay, P. "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors", *Advances in enzyme regulation*, 1984, 22, 27-55) se usó para calcular el IC para la fórmula de combinación de cada fármaco. Por lo tanto, el valor IC se usó para determinar si hay un efecto sinérgico entre el compuesto 1 y gemcitabina, y/o paclitaxel en este estudio. En las líneas celulares AsPC-1, CaPan-2 y Panc-1, las dos o tres combinaciones de compuestos del compuesto 1 con fármacos de quimioterapia, paclitaxel y gemcitabina, fueron fuertemente sinérgicas ($IC < 1$, FIG. 11) a través de todo el intervalo de dosis (p. ej., véase las FIG. 10 y 11). Estos resultados presentaron que el compuesto ejemplar (es decir, compuesto 1) con un segundo o tercero fármacos quimioterapéuticos usados actualmente inhiben fuertemente el crecimiento de cáncer de páncreas especialmente en la combinación de tres compuestos.

Actividad antitumoral *in vivo* del modelo de xenoinjerto subcutáneo de AsPC-1.

La actividad antitumoral de la terapia de combinación que comprende el compuesto 1 ejemplar se evaluó en los ratones desnudos que portan el tumor AsPC-1. Las células AsPC-1 se inyectaron subcutáneamente 7 días antes de comenzar el tratamiento de los ratones (Tabla 1). Estos animales recibieron entonces la administración diaria de diversas combinaciones de fármaco durante 28 días. En el día 28, todos los ratones de prueba se sacrificaron y los tumores correspondientes se extirparon para estudios adicionales. Como se muestra en las FIG. 13 y 14, al final de los experimentos, los ratones tratados con la combinación de compuesto 1 y gemcitabina (T3), o la combinación del compuesto 1 gemcitabina y paclitaxel (T6), mostraron una regresión tumoral altamente significativa con un lento crecimiento en el volumen tumoral. Los ratones en los otros cuatro grupos de tratamiento mostraron un estricto crecimiento tumoral en comparación con los grupos T3 y T6. La tasa de inhibición del crecimiento tumoral aumentó significativamente en la combinación de compuesto 1 y gemcitabina (T3), o la combinación del compuesto 1, gemcitabina y paclitaxel (T6) (FIG. 15) en comparación con los grupos (FIG. 16, T2, T4 y T5).

La FIG. 17 ilustra los resultados del tratamiento representados por las imágenes de ultrasonido del xenoinjerto de tumor pancreático de AsPC-1 durante el periodo de tratamientos. Las fotografías de los tumores de los ratones sacrificados se muestran en la FIG. 18A. Puede verse que los volúmenes tumorales en ratones tratados con el compuesto 1 y gemcitabina son significativamente menores que los tratados con otras combinaciones. En particular, la FIG. 18B muestra que el peso del tumor en los ratones tratados con compuesto 1 y gemcitabina es mucho menor en comparación con los otros grupos. Todos estos resultados demuestran que la terapia de combinación descrita en la presente memoria tiene una eficacia inhibidora del crecimiento tumoral predominante. La tasa inhibidora tumoral (TIR) en cada grupo se calculó también en base a los pesos tumorales finales (FIG. 19). El crecimiento tumoral se inhibió significativamente en los grupos de compuesto 1 más gemcitabina (FIG. 19, T3), y el compuesto 1 más los otros dos fármacos (FIG. 19, T6).

Para confirmar que la eficacia terapéutica de la terapia de combinación basada en el compuesto 1 ejemplar es mucho mejor que la del fármaco de mono-quimioterapia, los efectos sinérgicos de las combinaciones de fármaco seleccionadas se evaluaron por el volumen tumoral de la relación tratamiento a control (TCR, por sus siglas en inglés), la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y la relación inhibidora del tumor (TIR). En los xenoinjertos de AsPC-1, la monoterapia del compuesto 1 fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral, con relaciones de tratamiento a control (TCR) de 0,55. La combinación del compuesto 1 y la gemcitabina (tabla 4, Ge + Aq) produjo una actividad antitumoral dramáticamente aumentada en comparación con los demás tratamientos de un compuesto o combinaciones de dos compuestos (TCR 0,36; tabla 4; Fig. 13). Mientras tanto, la combinación con tres medicinas que comprenden compuesto 1 (tabla 4, Px + Ge + Aq) también indujo una fuerte actividad antitumoral en comparación con cualquiera de monoterapias u otras terapias de combinación (TCR 0,46; tabla 4; Fig. 13). Según esos resultados, el compuesto 1 en combinaciones con gemcitabina, o con paclitaxel adicional tienen actividad antitumoral mejorada, significativamente.

Además, no se observó una pérdida de peso significativa en los ratones que portaban un tumor tratados con diversas combinaciones, indicando efectos secundarios insignificantes del compuesto 1 y otros dos fármacos de quimioterapia para terapia tumoral a las dosis empleadas (FIG. 12). De manera coherente, el compuesto 1 y sus combinaciones no afectaron al número de células sanguíneas excepto para la glucosa en sangre en el xenoinjerto de AsPC-1 (tabla 5). Según estos datos, sugiere que el compuesto 1 y/o sus combinaciones de los mismos tienen bajo riesgo de seguridad en tomarlos oralmente.

Tabla 4. Peso tumoral de tumores extirpados en el momento del sacrificio de los ratones desnudos macho que portan un xenoinjerto de tumor pancreático de AsPC-1 subcutáneo después de 28 días de tratamientos.

	Grupos de tratamiento [#]					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Peso del tumor	0,42 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,07 ^b	0,11 ± 0,05 ^b	0,22 ± 0,16 ^b	0,31 ± 0,21 ^b	0,24 ± 0,09 ^b

#Seis grupos de tratamiento de los ratones administrados con aceite de maíz (T1), compuesto 1 (T2), combinación de compuesto 1 y gemcitabina (T3), combinación del compuesto 1 y paclitaxel (T4), combinación de gemcitabina y paclitaxel (T5) y combinación del compuesto 1, gemcitabina, y paclitaxel (T6).

- Los pesos del tumor son medias $\pm$ EEM. Los valores en la misma fila van seguidos por un superíndice diferente (a-b) están significativamente a $P < 0,05$.

Tabla 5. Actividad antitumoral sinérgica por combinaciones del compuesto 1 (Aq), paclitaxel (Px) y gemcitabina (Ge) en el xenoinjerto de AsPC-1.

Xenoinjerto	Tratamiento	Respuesta, TCR	TGI (%)	TIR (%)
AsPC-1	Control	1,00	-	-
	Aq	0,55	51	45
	Ge + Aq	0,36	73	64
	Px + Aq	0,60	49	40
	Px + Ge	0,67	40	33
	Px + Ge + Aq	0,46	65	54

Abreviaturas: Aq, compuesto 1; Px, paclitaxel; Ge, gemcitabina; TCR, volumen tumoral de la relaciones de tratamiento a control; TGI, volumen de la inhibición del crecimiento tumoral; TIR, relación de inhibición del peso del tumor.

Tabla 6. Valores hematológicos de cada grupo de tratamiento en el estudio de xenoinjerto de AsPC-1.

Parámetro	Unidad	T1 (control)	T2 (A)	T3 (G, A)	T4 (P, A)	T5 (P, G)	T6 (P, G, A)	Referencias del intervalo de 10-18 semanas de ratones ICR hembras
WBC	$10^9/L$	$6,10 \pm 0,83$	$7,34 \pm 0,71$	$8,92 \pm 1,11$	$8,65 \pm 0,64$	$7,33 \pm 1,46$	$7,65 \pm 0,92$	4,20-8,86
RBC	$10^{12}/L$	$9,16 \pm 1,34$	$9,93 \pm 1,34$	$9,12 \pm 0,94$	$9,05 \pm 1,22$	$9,77 \pm 1,43$	$9,26 \pm 1,57$	7,99-10,83
HGB	g/dL	$15,5 \pm 0,9$	$15,6 \pm 1,1$	$15,7 \pm 0,4$	$14,6 \pm 2,9$	$16,2 \pm 1,4$	$16,1 \pm 1,9$	14,3-16,7
HCT	%	$51,2 \pm 1,6$	$50,3 \pm 1,8$	$52,1 \pm 2,1$	$54,9 \pm 2,7$	$53,9 \pm 2,1$	$55,9 \pm 3,3$	49,0-63,1
MCV	fL	$54,9 \pm 1,7$	$53,6 \pm 2,3$	$57,6 \pm 4,1$	$53,1 \pm 1,4$	$56,6 \pm 4,3$	$53,1 \pm 5,3$	53,6-65,4
MCH	pg	$15,4 \pm 0,5$	$15,3 \pm 0,3$	$15,5 \pm 0,7$	$16,1 \pm 0,6$	$16,1 \pm 1,1$	$16,1 \pm 1,9$	15,8-16,8

Abreviaturas: WBC – recuento de glóbulos blancos, RBC – células sanguíneas rojas, HGB – hemoglobina, HCT – hematocrito, MCV – volumen corpuscular medio, MCH – hemoglobina corpuscular media. Los valores son medias $\pm$ EEM (n = 3 en cada grupo de tratamiento).

Como se muestra en los resultados del estudio, se muestra claramente los beneficios inesperados superiores utilizando las composiciones que comprenden el compuesto 1 ejemplar y los fármacos de quimioterapia clínica actuales como paclitaxel y gemcitabina frente al cáncer de páncreas. Los estudios de viabilidad celular mostraron que los tratamientos con dichas combinaciones dieron por resultado una actividad de inhibición mucho mayor que el compuesto 1 o los otros fármacos de quimioterapia solos, sugiriendo un efecto sinérgico y/o aditivo. Dicho efecto se confirmó por las combinaciones de compuesto 1 con gemcitabina sola, y con paclitaxel adicional que muestra una inhibición significativa de crecimiento tumoral en ratones que portan tumores.

Ejemplo 3. Un estudio en fase I para determinar la dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés) y para evaluar la seguridad/tolerancia, farmacocinéticas, farmacodinámicas y eficacia preliminar del compuesto 1 en combinación con nab+paclitaxel+gemcitabina en cáncer de páncreas metastásico de primera línea

Introducción: en 2011, la combinación multifármaco de leucovorina, fluorouracilo, irinotecano y oxaliplatina (FOLFIRINOX) se anotó para proporcionar una supervivencia media aumentada de 4,3 meses frente a la gemcitabina; sin embargo, dado su perfil de efectos secundarios, está disponible solo para un grupo selecto de pacientes con cáncer de páncreas avanzado. Los pacientes se asignaron aleatoriamente para recibir FOLFIRINOX o gemcitabina. La supervivencia general mediana (OS, por sus siglas en inglés) fue 11,1 meses en el grupo de FOLFIRINOX en comparación con 6,8 meses en el grupo de gemcitabina (relación de riesgo [HR] por muerte = 0,57; 95% de intervalo de confianza [IC], 0,45 a 0,73; $p < 0,001$). La supervivencia libre de progresión mediana (PFS) fue 6,4 meses en el grupo de FOLFIRINOX y 3,3 meses en el grupo de gemcitabina (HR para la progresión de la enfermedad = 0,47; 95% de IC; 0,37 a 0,59; $p < 0,001$).

Más recientemente, la combinación de gemcitabina más nab-paclitaxel (la formulación de nanopartículas unidas a albúmina de 130 nm de paclitaxel) se mostró que aumenta la supervivencia mediana en 1,8 meses, con OS aumentado a 1 y 2 años; los efectos adversos fueron razonables e incluían citopenias y neuropatía periférica. El ensayo MPACT en fase III, internacional, multicentro, incluyó 861 pacientes con adenocarcinoma pancreático metastásico no tratado previamente. Los pacientes se asignaron aleatoriamente para recibir gemcitabina y nab-paclitaxel o monoterapia de gemcitabina. El OS mediano fue 8,5 meses en el grupo de nab-paclitaxel/gemcitabina en comparación con 6,7 meses en el grupo de gemcitabina (HR para la muerte = 0,72; 95% de IC, 0,62 a 0,83; $p < 0,001$). La PFS mediana fue 5,5 meses en el grupo de nab-paclitaxel/gemcitabina y 3,7 meses en el grupo de gemcitabina (HR para la progresión de la enfermedad = 0,69; 95% de IC, 0,58 a 0,82, $p < 0,001$).

Las recomendaciones actuales de la Red nacional integral del cáncer sugieren combinaciones aceptables de quimioterapia de primera línea para pacientes con buen estado funcional (es decir, estado funcional (PS, por sus siglas en inglés) del grupo de oncología cooperativa del este (ECOG) de 0 o 1), en base a la preferencia del paciente y el sistema de apoyo disponible. Estas combinaciones incluyen FOLFIRINOX para pacientes con perfil de comorbilidad mejor/favorable, o gemcitabina más nab-paclitaxel para pacientes con perfil de comorbilidad adecuado/aceptable, nab-paclitaxel + gemcitabina, y gemcitabina más erlotinib. La gemcitabina sola se recomienda para pacientes con ECOG PS 2 o con un perfil de comorbilidad que descarta otros regímenes; la adición de capecitabina o erlotinib puede ofrecerse. Las directrices para elegir un régimen de tratamiento apropiado para pacientes con cáncer de páncreas metastásico permanece por tanto, ambiguo, y en ausencia de un ensayo aleatorizado que compare los regímenes de combinación cara a cara, la terapia de primera línea más apropiada para estos pacientes no queda clara.

Como se muestra en el ejemplo 2, el compuesto 1 ejemplar ha mostrado actividad antitumoral y un bajo perfil de toxicidad en experimentos animales preclínicos *in vitro* e *in vivo*. En un estudio no clínico separado usando el modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas humano PANC-1 ortotópico con compuesto 1 realizado en 2012, se trataron cuatro grupos de ratones con 30 mg/kg, 60 mg/kg, 90 mg/kg de compuesto 1 y vehículo de control, respectivamente para examinar la eficacia terapéutica *in vivo* del compuesto 1. Se midieron los volúmenes tumorales y los pesos tumorales 10 días después del tratamiento con fármaco (19 días después de la implantación del tumor). El tratamiento con compuesto 1 a 30, 60 y 90 mg/kg produjo una actividad antitumoral eficaz con volúmenes tumorales y pesos tumorales medios estadísticamente significativamente más pequeños en los tres niveles de dosificación en comparación con el vehículo de control. Las tres dosis de antroquinonol fueron bien toleradas por los ratones que portaban el tumor: no se observó una grave pérdida de peso durante el estudio.

En los estudios tempranos del ensayo clínico presentados, el antroquinonol (es decir, compuesto 1) en niveles de dosis de 50, 100, 200, 300, 450 y 600 mg, dado diariamente durante 4 semanas, fue generalmente seguro y bien tolerado, ya que no se identificaron preocupaciones de seguridad particulares o DLT en este estudio. Los datos generados a partir de los perfiles de seguridad y farmacocinéticos (PK) en este estudio pudieron soportar más estudios de antroquinonol en sujeto con malignidades avanzadas para determinar la dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés) y la eficacia en poblaciones de pacientes dados.

Objetivos del estudio

Los objetivos principales de este estudio son: determinar la MTD o dosis máxima factible (MFD, por sus siglas en inglés) del compuesto 1 en combinación con nab+paclitaxel+gemcitabina en sujetos con cáncer de páncreas metastásico. Aunque el compuesto 1 se ha evaluado para un tratamiento de cáncer, se sabe en el campo que muchos fármacos para el cáncer son menos eficaces en el tratamiento de cáncer metastásico.

Expansión de la cohorte: para evaluar la actividad antitumoral del antroquinonol en combinación con nab+paclitaxel+gemcitabina en sujetos con cáncer de páncreas metastásico.

Los objetivos secundarios de este estudio son:

Aumento de dosis:

- Evaluar la seguridad y tolerabilidad de la combinación de antroquinonol y nab+paclitaxel+gemcitabina.
- Caracterizar la PK de antroquinonol y nab+paclitaxel+gemcitabina.
- Evaluar la actividad de antroquinonol a partir de la monitorización rutinaria del cáncer de páncreas.

- Explorar la actividad antitumoral preliminar del antroquinonol en combinación con nab+paclitaxel+gemcitabina en sujetos con cáncer de páncreas metastásico.

Expansión de cohorte: evaluar la seguridad y tolerabilidad de MFD de la combinación de antroquinonol y nab+paclitaxel+gemcitabina; caracterizar la PK del antroquinonol y nab-paclitaxel-gemcitabina; evaluar la actividad del antroquinonol a partir de la monitorización rutinaria del cáncer de páncreas.

Puntos finales del estudio

Puntos finales principales

Aumento de la dosis:

- Ocurrencia de DLT en el 1^{er} ciclo de 28 días de tratamiento. La definición de DLT (graduando según los criterios de terminología común de NCI para eventos adversos [CTCAE] v.4.03):
- Toxicidad no hematológica de grado 3 o superior que excluye: diarrea, náuseas o vómitos de grado 3 que se resuelve en el periodo de 3 días desde el comienzo a grado 1 o a grado base con tratamiento apropiado
- Trombocitopenia o neutropenia de grado 4 que dura ≥ 48 horas.
- Neutropenia febril de $\geq$ grado 3

- Trombocitopenia de grado 3 con sangrado.
- Toxicidad persistente de grado 2 o mayor que provoca un retraso de más de 14 días en la administración de la dosis.

Los EA que se consideran por el investigador que están relacionados con la condición de la enfermedad subyacente, medicación simultánea o a nuevos eventos o tratamiento médicos no relacionados no se definirán como una DLT.

Expansión de la cohorte:

Punto final principal: evaluar la actividad antitumoral del antroquinonol en combinación con nab+paclitaxel+gemcitabina en sujetos con cáncer de páncreas metastásico.

Puntos finales secundarios:

Seguridad: la seguridad se evaluará usando los EA, exámenes físicos, descubrimientos en el laboratorio (que incluyen química clínica, hematología y urinalisis), signos vitales (que incluyen presión sanguínea y pulso) y electrocardiogramas (ECG).

Eficacia: tasa de respuesta objetiva (ORR, por sus siglas en inglés), duración de la respuesta (DoR, por sus siglas en inglés), velocidad de control de la enfermedad (DCR, por sus siglas en inglés), y PFS usando las evaluaciones del investigador según RECIST 1.1 (las evaluaciones se dan cada 8 semanas), OS.

Farmacocinéticas: se evaluará la concentración en plasma de antroquinonol y la combinación nab+paclitaxel+gemcitabina y los parámetros de PK.

Biomarcadores: evaluar la actividad del antroquinonol a partir de monitorización rutinaria del cáncer de páncreas.

Plan de investigación

Diseño general del estudio y descripción del plan

Este es un estudio de fase I multicentro, abierto a inspección pública, de una sola rama, del compuesto 1 en combinación con nab-paclitaxel y gemcitabina en sujetos que no han tenido tratamiento de primera línea con carcinoma de páncreas metastásico en etapa IV.

La primera parte del estudio seguirá un diseño de aumento de dosis de 3+3 para determinar la MTD o MFD (en base a la PK y la fuerza de las cápsulas) de antroquinonol en combinación con el régimen de dosis estándar de nab-paclitaxel y gemcitabina. Se planean dos niveles de dosis de antroquinonol dado TID en base a los datos de aumento de dosis y fuerzas de las cápsulas. El número final de sujetos estará basado en el número de niveles de dosis investigadas y la ocurrencia de DLT. Pueden tratarse hasta 12 sujetos en esta parte de estudio. Un comité de monitorización de la seguridad (SMC) se establecerá para este estudio para revisar las DLT y los datos generales de seguridad y juzgar la relevancia de los eventos en el esquema de aumento de la dosis.

Después de la determinación de MTD/MFD, la inscripción continuará con una dosis fija de antroquinonol (MTD o MFD). Está previsto un máximo de 40 sujetos evaluables en esta parte del ensayo de expansión de cohorte.

Producto de investigación, dosificación y modo de administración

- Dosis en aumento de compuesto 1 (200 a 300 mg) por administración TID, oral, hasta la toxicidad inaceptable o progresión de la enfermedad, y en ausencia de criterios de suspensión.
- 5 • 125 mg/m² de nab-paclitaxel y 1000 mg/m² de gemcitabina por medio de infusión intravenosa (IV), ambos administrados los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días (es decir, 1 ciclo = semanalmente durante 3 semanas, después 1 semana libre) hasta toxicidad inaceptable o progresión de la enfermedad.

Definición de DLT y evaluación

10 La toxicidad limitante por la dosis se define como la ocurrencia de cualquiera de las toxicidades esbozadas a continuación que se dan durante el periodo de evaluación de DLT que se determina que están relacionadas o posiblemente relacionadas con la combinación de productos medicinales en investigación (IMP, por sus siglas en inglés). El periodo de evaluación de DLT será el primer ciclo de tratamiento de 28 días. La gradación de toxicidad se determinará usando NCI CTCAE versión 4.03. Las toxicidades limitantes por la dosis se definirán como:

- Toxicidad no hematológica de grado 3 o superior que excluye:
 - 15 - Diarrea, náuseas y vómitos de grado 3 que se resuelve en el periodo de 3 días desde el comienzo a grado 1 o a grado base con tratamiento apropiado.
- Trombocitopenia o neutropenia de grado 4 que dura 248 horas
- Neutropenia febril 2 de grado 3
- Trombocitopenia de grado 3 con sangrado
- 20 • Toxicidad persistente de grado 2 o superior que provoca un retraso de más de 14 días en la administración de la dosis.

Los EA que se consideran por el investigador que están relacionados con la condición de enfermedad subyacente, medicación simultánea, o a nuevos eventos médicos o tratamiento nuevos no relacionados no se definirán como una DLT.

Selección de la población de estudio

25 Criterios de inclusión: para ser elegibles para participar en el estudio, los sujetos deben cumplir los siguientes criterios:

1. Sujetos hombres o mujeres ≥ 18 años o mayores.
2. Adenocarcinoma ductal metastásico del páncreas confirmado histológicamente o citológicamente, medible según el RECIST 1.1.
- 30 3. La enfermedad metastásica tenía que haberse diagnosticado en el periodo de 6 semanas antes de la aleatorización.
4. Sujetos que no han recibido tratamiento con adenocarcinoma ductal pancreático metastásico que no han recibido terapia sistémica previa (excepto terapia adyuvante o neoadyuvante si la progresión ocurrió hace > 6 meses desde el último tratamiento o cirugía, respectivamente, y no antes de nab-paclitaxel).
5. Función hematológica, hepática y renal adecuadas, que incluyen:
 - 35 - Hemoglobina ≥ 9 g/dL
 - Recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1500/\text{mm}^3$
 - Recuento de plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$
 - Bilirrubina total $\leq 1,5 \times$ límite superior de la normal (ULN, por sus siglas en inglés) excepto sujetos con síndrome de Gilbert documentado ($>3 \times$ ULN)
 - 40 - Alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) $\leq 2,5 \times$ ULN; para sujetos con metástasis hepática, ALT y AST $\leq 5 \times$ ULN
 - Albúmina ≥ 3 mg/dL
 - Creatinina en suero $\leq 1,5$ mg/dL o aclaramiento de creatinina calculado ≥ 50 mL/min como se determina por la ecuación de Cockcroft-Gault

- ECOG de 0 o 1.

6. Para mujeres de pueden estar embarazadas, un resultado negativo de una prueba de embarazo en suero en el cribado y en el día 1.

5 7. Dispuestos a usar dos métodos médicamente aceptados y eficaces de contracepción de la lista posterior durante el estudio (tanto hombres como mujeres cuando sea apropiado) y durante 3 meses después de la última dosis del fármaco de estudio:

- Uso establecido de métodos hormonales orales, inyectados o implantados de contracepción

- Colocación de un dispositivo intrauterino o sistema intrauterino

10 - Métodos de barrera de contracepción: condón o capuchón oclusivo (diafragma o capuchón cervical/vaginal) con espuma/gel/película/crema/supositorio espermicida.

- Esterilización masculina (con la documentación apropiada posterior a la vasectomía de la ausencia de esperma en el eyaculado)

- Abstinencia real: cuando esto está en línea con el estilo de vida preferido y normal del sujeto.

8. ICF firmado.

15 9. Esperanza de vida ≥ 12 semanas.

Criterios de exclusión: los sujetos que cumplan cualquiera de los siguientes criterios no serán elegibles para participar en el estudio:

1. Neoplasmas en las células de las isletas o enfermedad avanzada localmente.

20 2. Fármaco de quimio-, hormona- o inmunoterapia o de investigación en el intervalo de 4 semanas o cinco vidas medias de la fecha de la primera administración del fármaco de estudio (cualquiera que sea más corta) y/o persistencia de toxicidades de terapias anticancerígenas previas que se considera que son relevantes.

3. Tratamiento con cualquier fármaco(s) conocido(s) por ser un fuerte inhibidor o inductor del citocromo P450 (CYP) 2C19, CYP3A4, CYP2C8 y CYP2E1 en el periodo de 14 días de la fecha de la primera administración del fármaco de estudio y durante el tratamiento de estudio.

25 4. Otras malignidades diagnosticadas en el periodo de los últimos cinco años (distintas de cáncer de cuello de útero tratado de forma curativa in situ, cáncer de piel diferente a melanoma, tumores superficiales de vejiga Ta [tumor no invasivo] y TIS [carcinoma in situ], o cáncer de próstata no metastásico en etapa 1 o 2, que se ha tratado previamente con cirugía o terapia de radiación, y el antígeno específico de la próstata en suero está dentro de los límites normales [prueba realizada en el periodo de los últimos 12 meses antes de la fecha de la primera administración del fármaco de estudio]).

30 5. Sujetos con cualquier infección activa seria (es decir, que necesitan un agente antibiótico, antifúngico o antiviral intravenoso).

6. Sujetos con virus de inmunodeficiencia humana conocido, hepatitis B activa o hepatitis C activa.

35 7. Sujetos que tienen cualquier otra enfermedad que amenace la vida o disfunción del sistema orgánico, que en la opinión del investigador, podría comprometer la seguridad del sujeto o interferir con la evaluación de la seguridad del fármaco de estudio.

8. Abuso de sustancias o abuso de alcohol conocido o sospechado.

40 9. Enfermedad interviniente incontrolada, que incluye, pero no se limita a, infección en desarrollo o activa, fallo cardíaco congestivo sintomático, hipertensión incontrolada, angina de pecho inestable, arritmia cardíaca, enfermedad pulmonar intersticial, o enfermedad psiquiátrica/situaciones sociales que pudieran limitar el cumplimiento de las necesidades del estudio, aumentar sustancialmente el riesgo de incurrir en EA del tratamiento de estudio, o comprometer la capacidad del sujeto para dar el consentimiento informado por escrito.

10. Incapacidad de tragar medicamentos orales o un trastorno gastrointestinal agudo reciente con diarrea, p. ej., enfermedad de Crohn, malabsorción, o diarrea de grado >2 de CTCAE de cualquier etiología en la base.

45 11. Mujeres que están embarazadas o dando el pecho, u hombres o mujeres de potencial reproductivo que no están empleando un método eficaz de contracepción.

Retirada de sujetos: los sujetos pueden retirar su consentimiento a participar en el estudio y los investigadores pueden retirar a los sujetos en cualquier momento sin perjuicio. Los sujetos se retirarán del estudio o del tratamiento de estudio si ha ocurrido cualquiera de las condiciones indicadas a continuación:

1. Progresión de la enfermedad documentada según los criterios de respuesta.

5 2. Toxicidad inaceptable.

3. El sujeto decide retirar su consentimiento informado.

4. El investigador considera que el sujeto ya no es capaz física y/o psicológicamente de permanecer en el estudio.

Procedimientos de sustitución: durante la fase de aumento de dosis, un sujeto que no experimenta DLT en el primer ciclo y que cumple cualquiera de lo siguiente debería sustituirse con un nuevo sujeto:

- 10
- No se completaron todas las dosificaciones del tratamiento del ensayo planeadas en el primer ciclo de 28 días.
 - Se completaron todas las dosificaciones del tratamiento del ensayo planeadas con/sin retraso; sin embargo, el 90% de la dosis total planeada de cualquier fármaco no se administra en el primer ciclo.

Guía para los investigadores en cuando acabar el régimen del tratamiento de estudio: los sujetos pueden retirar su consentimiento a participar en el estudio y los investigadores pueden retirar sujetos en cualquier momento. Los sujetos se retirarán del estudio o tratamiento de estudio si se cumple cualquiera de las siguientes condiciones:

- 15
1. Pérdida de seguimiento.
 2. Cualquier EA o condición médica que el investigador o patrocinador determine que puede arriesgar la seguridad del sujeto si él o ella continúa en el estudio.
 3. Embarazo o intento de quedarse embarazada.
 - 20 4. No cumplimiento del sujeto que, en la opinión del investigador o patrocinador, garantiza la retirada de la medicación de estudio (p. ej., rechazo a adherirse a las visitas programadas).
 5. Inicio de terapia anticancerígena alternativa, incluyendo otro agente de investigación.
 6. Enfermedad progresiva confirmada y la determinación del investigador de que el sujeto no se está ya beneficiando del tratamiento en estudio.
 - 25 7. El patrocinador termina el estudio. Las razones para terminar el estudio puede incluir, pero no se limitan a, lo siguiente: la incidencia o gravedad de los EA en este u otros estudios indica un riesgo potencial para la salud de los sujetos; el enrolamiento del sujeto no es satisfactorio.

El seguimiento de sujetos se suspendió prematuramente del régimen de tratamiento del estudio o retirada del estudio:

- 30
- Todos los sujetos atenderán una visita de seguimiento de seguridad 28 días después de recibir la última administración de los tratamientos en estudio. A los sujetos que interrumpen el producto en investigación prematuramente se les pedirá volver a la clínica para una visita de terminación temprana y puede someterse evaluaciones de seguimiento en el formulario de informe de caso electrónico apropiado (eCRF).

Tratamiento de sujetos

- 35
- Tratamientos administrados: el compuesto 1 se administrará en dosis de 200 a 300 mg (niveles de dosis planeados), TID, dado en cápsulas de 100 mg (que da por resultado una dosis diaria de 600 mg a 900 mg). Los niveles de dosis adicionales pueden investigarse como se determina por el estudio SMC. El fármaco de estudio se llenará en cápsulas núm. 2 (100 mg) y luego se envasan en una botella de polietileno protegida de la luz y se cerró con un pedazo de recubrimiento del tapón de polietileno ajustado en el tapón para cada dispensación en la visita 1 (día 0), 3 (día 28), 4 (día 42), 5 (día 56), y 6 (día 84) y posteriores visitas para los sujetos que entran en la fase de extensión. El fármaco de estudio se etiquetará de acuerdo con los requisitos específicos del país. Se planean varias dosis de antroquinonol para el primer aumento de dosis parte del ensayo. El aumento de dosis seguirá un diseño 3+3 basado en la ocurrencia de DLT. La dosis de partida de antroquinonol será de 200 mg de TID, que es la dosis actualmente investigada en el desarrollo del ensayo de agente único en fase II en NSCLC. Si no hay DLT o $\leq 1/6$ de sujetos con DLT, la dosis se aumentará a 300 mg de TID. Una dosis (MTD o MFD) se investigará en la parte de expansión de cohorte del ensayo.

- 45
- Los sujetos recibirán antroquinonol mientras continúen para mostrar el beneficio clínico, como se juzgue por el investigador, y en ausencia de criterio de suspensión. El antroquinonol debería tomarse cada 8 horas aproximadamente 15 minutos después de una comida o ligero tentempié y no en el intervalo de ± 1 hora después de beber una bebida que contiene etanol, p. ej., una bebida alcohólica. Los sujetos que olvidan o son incapaces de tomar una dosis en el momento programado debería estar instruido en tomar la dosis tan pronto como sea posible. Si no

recuerdan o son incapaces de tomar la dosis antes de la siguiente dosis programada, deberían tomar la dosis programada y la dosis perdida no se realizará. La fecha y el tiempo de cada administración de fármaco de estudio deberían registrarse en el diario del sujeto.

La dosis recomendada de nab-paclitaxel en combinación con gemcitabina es de 125 mg/m² por medio de infusión IV durante 30 minutos en los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. La dosis recomendada (RD, por sus siglas en inglés) simultánea de gemcitabina es 1000 mg/m² por medio de infusión IV durante 30 minutos inmediatamente después de completarse la administración de nab-paclitaxel en los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. El tratamiento con nab-paclitaxel + gemcitabina continuará hasta la toxicidad inaceptable o progresión de la enfermedad. Por práctica clínica y la regulación local, en caso de toxicidad del sujeto, la administración de tratamiento del día 15 puede omitirse. En este caso, el comienzo del ciclo posterior comenzará temprano, el día 22 de la administración del primer ciclo (excepto por el ciclo 1, el periodo de DLT). El calendario de evaluación del tumor no se alterará (es decir, evaluaciones continuarán siendo cada 8 semanas).

Selección y tiempos de la dosis para cada sujeto: en la parte de aumento de dosis del estudio, los sujetos se enrolarán y se tratarán secuencialmente siguiendo un diseño de aumento de dosis 3+3. En la parte de expansión de cohorte, los sujetos se enrolarán y se tratarán en paralelo.

Variables de eficacia y seguridad

Evaluaciones de eficacia: los criterios RECIST 1.1 se usarán para evaluar la respuesta del sujeto al tratamiento mediante determinación de ORR, DoR, DCR, PFS, PFS 3 meses, y PFS 6 meses. Las directrices de RECIST 1.1 para lesiones medibles, no medibles, objetivo y no objetivo y los criterios de respuesta del tumor objetivos (respuesta completa [CR], respuesta parcial [PR], enfermedad estable [SD] o enfermedad progresiva) se presentan en base a criterios de evaluación de respuesta revisados en directrices de tumores sólidos Versión 1.1 – adaptación de la publicación original con adición de explicaciones complementarias. La OS, OS 6 meses y OS 12 meses también se evaluarán.

Las evaluaciones de base deberían realizarse no más de 28 días antes de comenzar el tratamiento de estudio e idealmente deberían realizarse tan cerca como sea posible al comienzo del tratamiento de estudio. La eficacia para todos los sujetos se evaluará mediante evaluaciones de tumor objetivas cada 8 semanas durante los primeros 12 meses y cada 12 semanas a partir de ahí hasta que se confirme la progresión de la enfermedad objetiva. Si una evaluación no programada se realiza y el sujeto no ha progresado, cada intento debería hacerse para realizar las evaluaciones posteriores en sus visitas programadas.

Se necesita un examen de confirmación después de la demostración inicial de enfermedad progresiva. El examen de confirmación debería darse preferiblemente en la siguiente visita programada y no antes de 4 semanas después de la evaluación inicial de enfermedad progresiva en ausencia de deterioro clínicamente significativo. El tratamiento continuará entre la evaluación inicial de la progresión y la confirmación para la progresión. Si un sujeto interrumpe el tratamiento (y/o recibe una terapia anticancerígena posterior) antes de la progresión, entonces el sujeto debería continuar siguiéndose hasta la progresión de la enfermedad objetiva confirmada.

La respuesta tumoral objetiva (CR o PR) debería confirmarse preferiblemente en la siguiente visita programada y no menos de 4 semanas después de la visita cuando la respuesta se observó primero.

Después de la progresión confirmada, los sujetos deberían continuar siendo seguidos por la supervivencia cada 2 meses (8 semanas). Además, se contactará con todo los sujetos en la semana después del corte de datos para confirmar el estado de supervivencia.

Evaluaciones de seguridad: la seguridad se monitorizará a lo largo del estudio para todos los sujetos. El análisis de los datos de seguridad se realizará usando el equipo de análisis de seguridad.

Eventos adversos:

Definiciones: el término “evento adverso”, como se usa por el patrocinador, es sinónimo con el término “experiencia adversa”, que se usa por la FDA.

Un EA es cualquier evento clínico inapropiado, indeseado, no planeado, en la forma de signos, síntomas, enfermedad u observaciones de laboratorio o fisiológicas que se dan en un ser humano que está participado en un estudio clínico con un artículo de prueba del patrocinador, a pesar de la relación causal. Esto incluye lo siguiente:

- Cualquier empeoramiento clínicamente significativo de una condición preexistente
- Nota: la aparición de un nuevo patógeno asociado con un evento clínico durante la terapia en un sitio distinto del sitio inicial de infección se considerará que es un EA.
- Cualquier recurrencia de una condición preexistente

- Un EA que se da a partir de la sobredosis de un fármaco de estudio del patrocinador sea accidental o intencional (es decir, una dosis mayor que la prescrita por un profesional de la salud por razones clínicas)
- Un EA que ocurre a partir del abuso de un fármaco de estudio patrocinador (es decir, el uso de razones no clínicas)
- Un EA que se ha asociado con la interrupción del uso de un fármaco de estudio patrocinador.

5 Nota: un procedimiento no es un EA, pero la razón para un procedimiento puedes ser un EA.

Una condición preexistente es una condición clínica (que incluye una condición que se trata) que se diagnostica antes de que el sujeto firme el ICF y que está documentada como parte de la historia médica del sujeto.

10 Las preguntas que conciernen a si la condición que existía antes del comienzo de la fase activa del estudio y si ha aumentado en gravedad y/o frecuencia se usará para determinar si un evento es un TEAE. Un EA se considera que aparece con el tratamiento si (1) o está presente cuando la fase activa del estudio comienza y no es una condición crónica que es parte del historial médico del sujeto, o (2) está presente al comienzo de la fase activa del estudio como parte del historial médico del sujeto, pero la gravedad o frecuencia aumenta durante la fase activa. La fase activa del estudio comienza en el momento de la primera dosis del fármaco de estudio. La fase activa del estudio acaba en la visita de seguimiento.

15 Informe de eventos adversos: en cada visita el investigador, o delegado, determinará si ha ocurrido algún EA o no. Se preguntará al sujeto de forma general y no se sugerirán síntomas específicos. Si ha ocurrido algún EA, se registrará en la sección de EA del eCRF y en el historial médico del sujeto. Si se sabe, el diagnóstico se registrará, en vez de enumerar las señales y síntomas individuales.

20 La información de eventos adversos comienza desde el momento del consentimiento informado y acaba 30 días después de la última dosis de IMP.

Evaluación de la gravedad: la escala de graduación de la gravedad de la EA para NCI CTCAE (versión 4.03) se usará para evaluar la gravedad del EA. Para los EA que no están enumerados específicamente en la NCI CTCAE, se usarán las siguientes definiciones:

- 25 • Grado 1: suave, asintomático o con síntomas suaves; solo observaciones clínicas o diagnósticas; o intervención no indicada.
- Grado 2: moderado; intervención mínima, local o no invasiva indicada; o que limita las actividades instrumentales apropiadas para la edad de la vida diaria.
- 30 • Grado 3: grave o médicamente significativo, pero que no amenaza la vida inmediatamente; hospitalización o prolongación de la hospitalización indicada; incapacitante; o limitante de las actividades de autocuidado de la vida diaria.
- Grado 4: consecuencias que amenazan la vida o intervención urgente indicada.
- Grado 5: muerte relacionada con el EA.

Relación con el tratamiento de estudio: el investigador hará una determinación de la relación del EA con el fármaco de estudio usando un sistema de cuarta categoría según las siguientes directrices:

- 35 • No relacionado: evento clínico con una relación de tiempo incompatible con la administración del fármaco, y que podría explicarse por la enfermedad subyacente u otros fármacos o compuestos químicos o está incontrovertiblemente no relacionado con el fármaco de estudio.
- 40 • Improbable: evento clínico cuya relación de tiempo con la administración del fármaco hace una conexión causal improbable, pero podría explicarse de forma plausible por la enfermedad subyacente u otros fármacos o compuestos químicos.
- Posible: evento clínico con una relación de tiempo razonable con la administración de fármaco de estudio, pero que podría también explicarse por enfermedad simultánea u otros fármacos o compuestos químicos.
- Cierto: evento clínico con relación de tiempo plausible con la administración del fármaco de estudio, y que no puede explicarse por enfermedad simultánea u otros fármacos o compuestos químicos.

45 Seguimiento de eventos adversos: es importante para los investigadores conseguir información de enfermedades subyacentes, fármacos simultáneos y relaciones temporales del comienzo del evento con el momento de dosificación del fármaco de estudio, y resultados retadores, teniendo en cuenta cuando se hace una decisión de relación causal. Es la responsabilidad del investigador seguir proactivamente los resultados de cada EA hasta la resolución o estabilización de la condición, que se comience un tratamiento alternativo para el cáncer de páncreas, 6 meses después de la última dosis del fármaco de estudio, o pérdida de seguimiento, lo que ocurra primero. En el evento de

toxicidades serias o relacionadas con el fármaco de estudio, el sujeto se seguirá hasta la resolución o estabilización. Los datos de seguimiento de seguridad pueden recogerse por contacto telefónico cada 3 meses después de la visita final del estudio.

Eventos adversos serios: un evento adverso serio (EAS) es cualquier EA que se da a cualquier dosis que cumpla 1 o más de los siguientes criterios:

- Da por resultado la muerte
- Amenaza la vida (véase a continuación)
- Necesita hospitalización del sujeto o prolongación de una hospitalización existente (véase a continuación)
- Da por resultado una discapacidad o incapacidad persistente o significativa (véase a continuación)
- Da por resultado una anomalía congénita o defecto de nacimiento
- Da por resultado un evento médico importante (véase a continuación)

Adicionalmente, los eventos médicos importantes que pueden no dar por resultado la muerte, amenazar la vida o necesitar hospitalización pueden considerarse EAS cuando, en base a un juicio médico apropiado, pueden amenazar al sujeto y pueden necesitar intervención médica o quirúrgica para prevenir uno de los resultados enumerados anteriormente. Ejemplos de dichos eventos incluyen broncoespasmo alérgico que necesita un tratamiento intensivo en una sala de urgencias o en casa, discrasias sanguíneas o convulsiones que no necesitan hospitalización, o desarrollo de dependencia a fármacos o abuso de fármacos.

Un EA que amenaza la vida es cualquier EA que pone al sujeto en riesgo inmediato de muerte a partir de que ocurre el evento. Un evento que amenaza la vida no incluye un evento que habría provocado la muerte si hubiera ocurrido en una forma más grave pero que no creó un riesgo inmediato de muerte como si ocurriera realmente. Por ejemplo, la hepatitis inducida por fármacos que se resolvió sin evidencia de fallo hepático no se consideraría que amenace la vida, incluso aunque la hepatitis inducida por un fármaco de una naturaleza más grave puede ser fatal. La hospitalización se va a considerar solo como una admisión durante la noche.

La hospitalización o prolongación de una hospitalización es un criterio para considerar que un EA es serio. En ausencia de un EA, el investigador participante no debería informar de la hospitalización o prolongación de la hospitalización.

Además, una hospitalización planeada antes de comenzar el estudio por una condición preexistente que no ha empeorado no constituye un EAS (p. ej., hospitalización electiva para una sustitución de rodilla total debido a una condición preexistente de osteoartritis de la rodilla que no ha empeorado durante el estudio).

La discapacidad se define como una interrupción sustancial en la capacidad de una persona para llevar a cabo funciones vitales normales. Si hay cualquier duda con respecto a si un caso constituye un EA o EAS en base a la información disponible, el caso debería tratarse como un EAS.

Alternativamente, el juicio médico y científico debería ejercerse para decidir si un caso es serio en esas situaciones donde los eventos médicos importantes pueden no ser amenazantes para la vida inmediatamente o da por resultado la muerte, hospitalización, discapacidad o incapacidad. Estos incluyen eventos que pueden amenazar al sujeto o pueden necesitar intervención médica para evitar uno o más resultado enumerados en la definición de serio.

Análisis farmacocinético

Los análisis de PK no compartimentales se realizarán en datos de concentración de plasma individual. Los análisis de PK se realizarán usando un software comercial como PhoenixTM WinNonlin[®] Versión 6.4 o superior (Certara USA, Inc.). La concentración máxima en plasma ($C_{\text{máx}}$), la concentración mínima (predosis) ($C_{\text{mínima}}$) y el tiempo de $C_{\text{máx}}$ ($T_{\text{máx}}$) se tomarán directamente de los datos observados. El área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo (ABC_{τ}) se calculará usando la regla trapezoidal lineal. Los parámetros de PK se enumerarán para cada individuo y se resumirán por grupo de tratamiento usando las estadísticas descriptivas (tamaño de muestra [N], media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación [% de CV], mediana, mínimo, máximo y media geométrica). Los datos de concentración individuales se enumerarán y resumirán por grupo de tratamiento con estadísticas descriptivas (N, media aritmética, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo, media geométrica y % de CV). Los perfiles de concentración en plasma-tiempo medios e individuales se presentarán gráficamente en las escalas tanto lineales como semilogarítmicas.

Los tiempos de administración de dosis reales y los tiempos de recogida de muestra se usarán para los análisis como se grabaron en el formulario de informe de caso. Las concentraciones en plasma por debajo del límite inferior de cuantificación se ajustarán a cero para el análisis. Las estimaciones de parámetros farmacocinéticos serán tres o cuatro figuras significativas para la presentación. No se harán intentos de estimar datos perdidos. Otros parámetros y procedimientos de manejo de datos pueden añadirse cuando sea apropiado. Solo los sujetos a los que se está dando

antroquinonol activo y tienen perfiles de concentración-tiempo evaluables se incluirán en el análisis. Todos los análisis estadísticos usarán estimaciones de parámetros no redondeados.

Un desarrollo y análisis del modelo de PK poblacional (PopPK) puede realizarse usando métodos de efectos mixtos. Datos de dosificación, muestreo, demográficos y de laboratorio de cada sujeto se montarán en una base de datos adecuada para un análisis poblacional. Un modelo de efectos mixtos no lineal se desarrollará usando NONMEM (Globomax, Ellicott City, MD). Se evaluarán diversos modelos estructurales como se indica por los datos. Los efectos covariables (edad, género, raza, tamaño corporal, historial fumador, etc.) se evaluarán y se incorporarán en el modelo usando enfoques univariados o multivariados. Una vez que se ha establecido el modelo óptimo, se validará usando métodos estándar, como comprobaciones predictivas visuales y análisis bootstrap.

- 10 Las relaciones potenciales de exposición-exposición/concentración podrían evaluarse en base a las estimaciones a posteriori de la exposición a antroquinonol (es decir, el modelo predijo $C_{\text{máx}}$, $C_{\text{mínima}}$ y ABC_t) a partir del modelo PopPK anterior o las observaciones de concentración.

Métodos estadísticos

Consideración general: para fines de reporte del estudio se considerarán los siguientes aspectos:

- 15 • Las estadísticas descriptivas y las presentaciones gráficas serán las principales herramientas de análisis.
- Se informará de la disposición del sujeto para cada nivel de dosis usando el conjunto de todos los sujetos tanto para las fases del estudio, como para los perfiles de los sujetos que se presentarán para la fase de aumento de dosis del estudio solo.
- 20 • Para todos los análisis, se presentarán los resultados y representación gráfica de los datos del sujeto individual por nivel de dosis. El nivel de dosis al que se asignó un sujeto en el primer tratamiento se indicará en todos los resultados.

Las estadísticas descriptivas y representaciones gráficas se usarán para resumir los datos para cada nivel de dosis. La siguiente estadística de resumen se usará para resumir los datos del ensayo por nivel de dosis en base a su naturaleza, a menos que se especifique otra cosa:

- 25 • Variables continuas: número de observaciones no perdidas (N), media, desviación estándar, mediana, mínimo y máximo, 95% de IC se presentará cuando sea apropiado.
- Variables por categorías: Frecuencias y porcentajes.

Los detalles del análisis estadístico se presentarán en el plan de análisis estadístico.

Análisis de eficacia

- 30 Medidas de los resultados principales:

Fase de aumento de dosis: el número y proporción de sujetos que experimentan DTL en cada nivel de dosis durante el ciclo 1 se evaluará en el conjunto de análisis de DLT.

- 35 Fase de expansión de cohorte: resumen descriptivo de los sujetos con la mejor respuesta general en cada categoría (CR, PR, SD, y enfermedad progresiva); la tasa de respuesta objetiva (CR+PR); la tasa de control de la enfermedad (CR+PR+SD [SD de ≥ 16 semanas]) con 95% de IC según RECIST 1.1 se realizarán en el conjunto de análisis de eficacia.

- 40 Criterios en tumores sólidos (RECIST) versión 1.1 se realizarán por tiempo de OS mediana y se evaluará el tiempo de PFS con 95% de IC usando los métodos de Kaplan-Meier en el conjunto de análisis completo. La OS se define como el tiempo desde la primera dosis del fármaco de estudio hasta la muerte del sujeto. El PFS se define como el tiempo desde la primera dosis del fármaco de estudio al comienzo de la progresión de la enfermedad o la muerte del sujeto, lo que ocurra primero.

Análisis de las medidas de resultados secundarios: los datos de puntos finales secundarios se enumerarán por nivel de dosis, sujeto y visita (si es aplicable). Los puntos finales secundarios serán descriptivos analizados por el nivel de dosis en el conjunto de análisis relevante.

- 45 Análisis de seguridad y tolerabilidad: se resumirán el número y proporción de sujetos que experimentan TEAE; exposición a fármacos; cambios clínicamente significativos en los parámetros del laboratorio, signos vitales, exámenes médicos, peso, estado funcional ECOG, ECG, y/u oximetría del pulso, juzgados por estar relacionados con la medicación del ensayo; y el número y razones de las muertes.

La evaluación de seguridad incluirá la incidencia de EA (o TEAE), resultados de pruebas de laboratorio, signos vitales, resultados de ECG y descubrimientos de examen físico. Todos los resúmenes de datos de seguridad estarán basados en el conjunto de análisis de seguridad. No se realizarán análisis estadísticos formales de los datos de seguridad.

- 5 Las tablas de resumen se presentarán para todos los efectos adversos (EA) por nivel de dosis y diccionario médico para las actividades reguladoras SOC y los términos preferidos donde sea aplicable. La incidencia y tipo de los siguientes EA se analizarán.

Un EA se considerará como "emergente del tratamiento" si ocurrió después del primer tratamiento del estudio o si ocurrió antes del primer tratamiento del estudio y empeoró a partir de ahí.

- 10 Las tablas de resumen de TEAE incluirán recuentos de sujetos. Por lo tanto, si un sujeto experimenta más de un episodio de un EA particular, el sujeto se contará solo una vez para ese evento. Si un sujeto tiene más de un EA que está codificado al mismo término preferido, el sujeto se contará solo una vez para ese término preferido. De forma similar, si un sujeto tiene más de un EA en un SOC, el sujeto se contará solo una vez en ese SOC.

Todas las muertes y las muertes en un periodo de 30 días de la última dosis del tratamiento de estudio además de las razones de la muerte se tabularán por nivel de dosis. La exposición al fármaco se resumirá por nivel de dosis.

- 15 Las variables de pruebas de laboratorio clínicamente significativas se resumirán por nivel de dosis y visita (si es aplicable) usando estadísticas descriptivas (número de sujetos, media, desviación estándar, mínimo, máximo, además del cambio medio desde la base, desviación estándar para la media y error estándar para el cambio de la media, mínimo, mediana, máximo y número y porcentaje de sujetos en las categorías especificadas). Las tablas de cambios (es decir, tabulaciones cruzadas de por debajo del límite inferior del intervalo normal, dentro de los límites del intervalo normal y por encima del límite superior del intervalo normal en la base frente a las visitas programadas) se presentarán mediante pruebas de laboratorio (si es aplicable). Las pruebas de laboratorio con resultados de categorías que no pueden analizarse por cambio desde la base o análisis de tablas de cambios no se incluirán en estos resúmenes, pero se enumerarán. Los datos obtenidos de las pruebas de laboratorio no necesarios por el protocolo no se resumirán, pero se enumerarán.
- 20
- 25 Las estadísticas descriptivas de los signos vitales, peso y resultados ECG en cada visita se presentarán mediante el grupo de tratamiento. Los descubrimientos del examen físico se enumerarán para cada sujeto. La tasa de respuesta general y los DCR se estimarán junto con el 95% de IC calculados usando el método de Clopper y Pearson por nivel de dosis.

Análisis farmacocinético

- 30 Muestreo farmacocinético: el muestreo de PK se realizará el día 0 y el día 28 en todos los sujetos enrolados en la primera etapa en los siguientes puntos temporales:
- Día 1: (aproximadamente 5 mL por muestra, 60 mL en total) 30 minutos antes de y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la primera dosis.
 - Día 28: (aproximadamente 5 mL por muestra, 60 mL en total) inmediatamente antes y 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8 horas después de la primera dosis del día 28.
- 35

Se realizarán muestreos de PK dispersos en los días 28, 42 y 56 en todos los sujetos enrolados en la etapa 2. Al menos dos muestras se recogerán en cada ocasión, una de las cuales será una concentración mínima (30 minutos antes de la primera dosis en los días 28, 42 y 56 y aproximadamente 8 horas después de la última dosis en el día anterior). Al menos una muestra por sujeto se planeará para coincidir con la concentración máxima (3 horas después de la primera dosis). El resto puede tomarse en cualquier momento durante el intervalo de dosificación.

40

Cada muestra de sangre se analizará para la concentración en plasma de antroquinolol para determinar los parámetros de PK después de la administración de antroquinolol usando un método bioanalítico completamente validado (una copia del informe de validación del método analítico y del informe bioanalítico se incluirán en el informe del estudio clínico).

- 45 Procedimientos de muestreo farmacocinético

Muestras de sangre: se obtendrán muestras de sangre venosa en tubos Vacutainer® con heparina sódica de 5 mL en los tiempos de muestreo preprogramados. Inmediatamente después de la recogida el tubo se invertirá suavemente 8 a 10 veces para mezclar el anticoagulante con la muestra de sangre. Todas las muestras se procesarán y colocarán en un congelador en el periodo de una (1) hora después de la recogida. La fracción de plasma se separará colocando el tubo de recogida en una centrífuga refrigerada (4 °C) durante 10 minutos a 3000 rpm. La fracción de plasma se retirará mediante una pipeta y se dividirá en dos tubos de congelación de polipropileno (recibiendo cada tubo aproximadamente alícuotas iguales). Todos los tubos de recogida de muestra y congelación estarán claramente etiquetados con el número de sujeto, el periodo de estudio y el tiempo de recogida. Las etiquetas se fijarán a los tubos

50

de congelación de manera que se evitará que la etiqueta se despegue después de la congelación. Todas las muestras de plasma se colocarán en un congelador a -70 °C en el periodo de 1 hora después de la recogida.

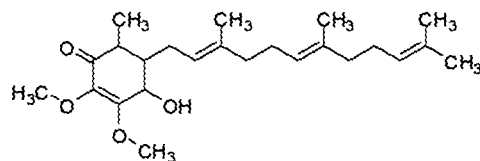
5 Metodología analítica: la concentración del fármaco de estudio se determinará a partir de las muestras de plasma usando un método analítico validado. Los detalles de la validación del método y el análisis de muestras se incluirán en el informe final del estudio clínico.

Resultados preliminares:

10 Los resultados preliminares de los pacientes con 600 mg diarios de dosificación muestran que el tamaño del tumor del paciente (mm) se redujo después de terminar el 3^{er} ciclo (8 semanas de tratamiento). El tamaño del tumor de un paciente se redujo un 7,6% de 91 mm a 84 mm, y el tamaño del tumor de otro paciente se redujo un 22% de 50 mm a 39 mm. La reducción preliminar del tamaño del tumor soporta además los beneficios superiores inesperados de las composiciones de la invención que comprenden el compuesto 1 ejemplar y los fármacos de quimioterapia clínica actuales como paclitaxel y gemcitabina frente al cáncer de páncreas como se muestra en el estudio animal.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para usar en el tratamiento de cáncer de páncreas en un sujeto que comprende



y uno o más agentes anticancerígenos, en donde el uno o más agentes anticancerígenos es erlotinib, 5-FU, oxaliplatina, irinotecano, gemcitabina, paclitaxel o una combinación de los mismos.

2. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde el uno o más agentes anticancerígenos es gemcitabina, paclitaxel o una combinación de los mismos.

3. La composición para usar según la reivindicación 1, que comprende además un agente de inmunoterapia.

4. La composición para usar según la reivindicación 1, en donde dicho compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable, o solvato del mismo, se administra de forma oral, parenteral, intravenosa o por inyección.

FIG. 1A-B

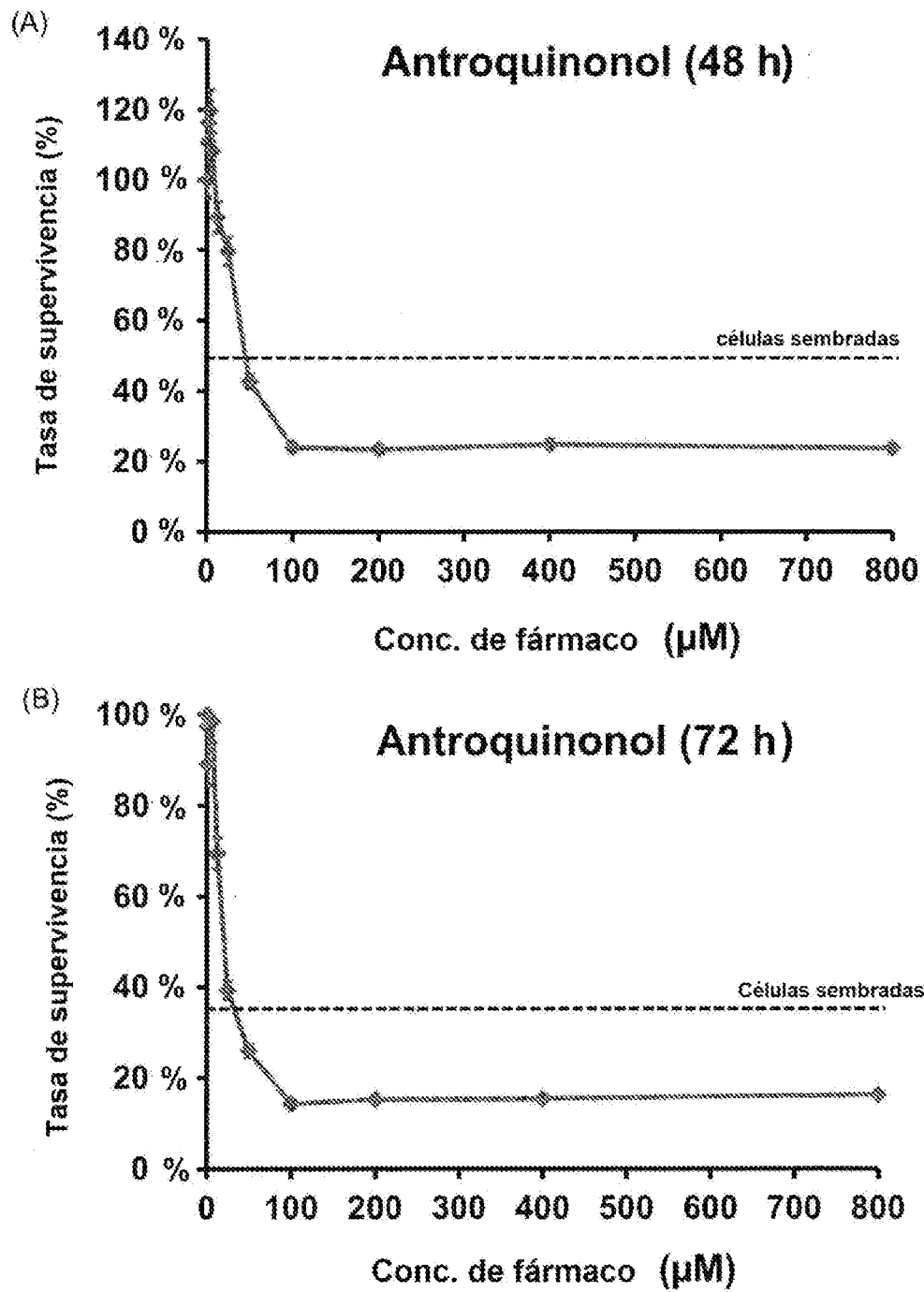


FIG. 2A-B

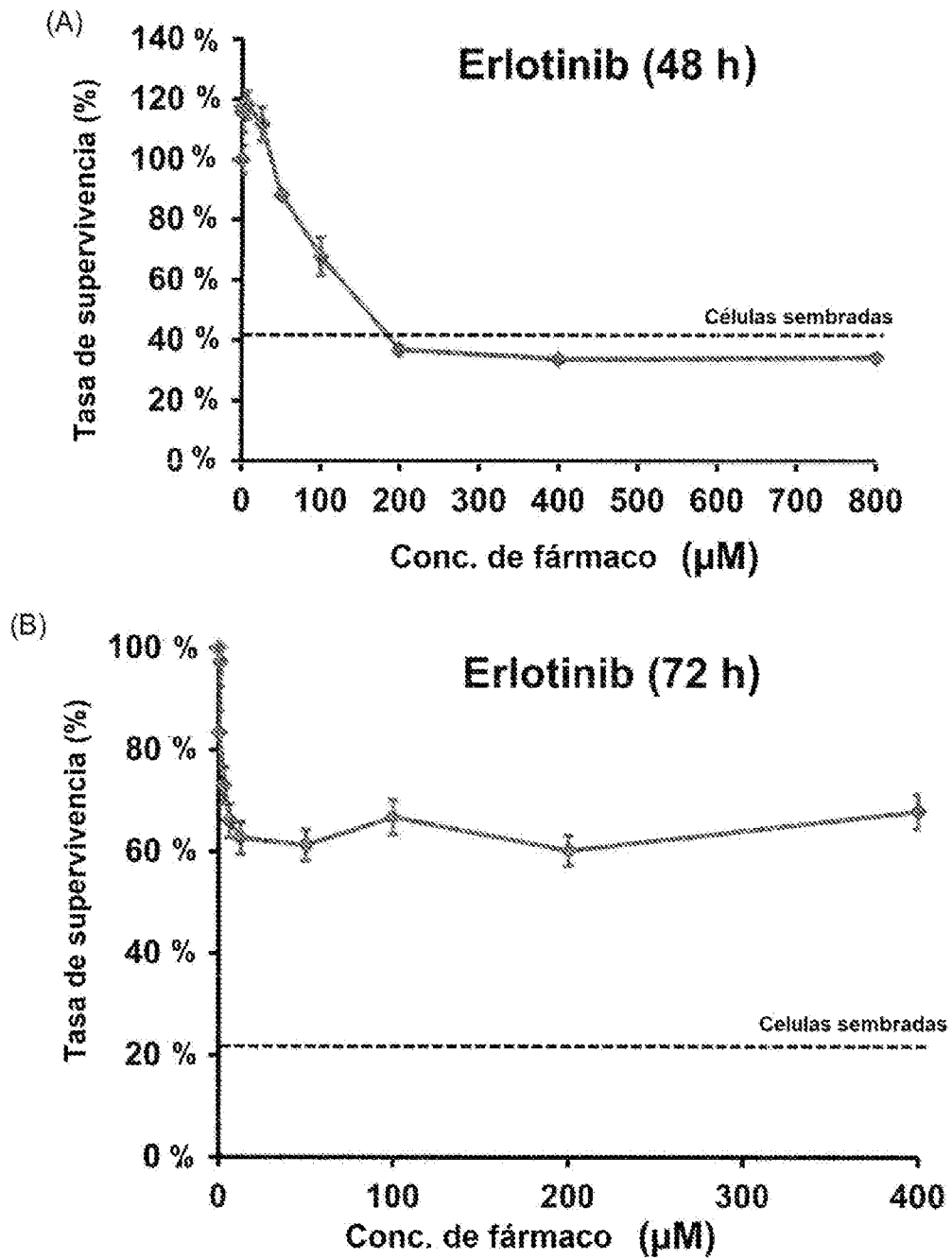


FIG. 3A-B

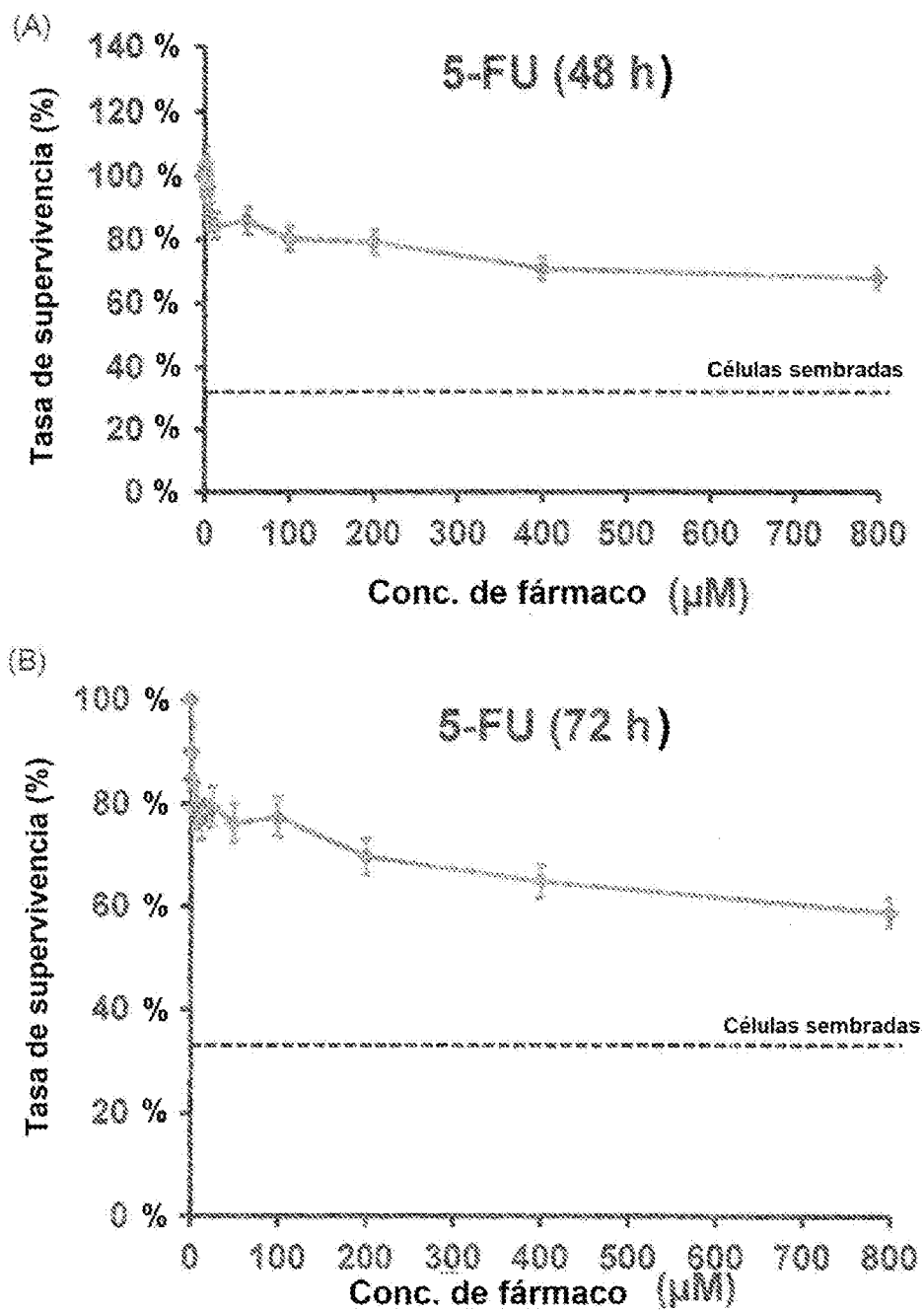


FIG. 4A-B

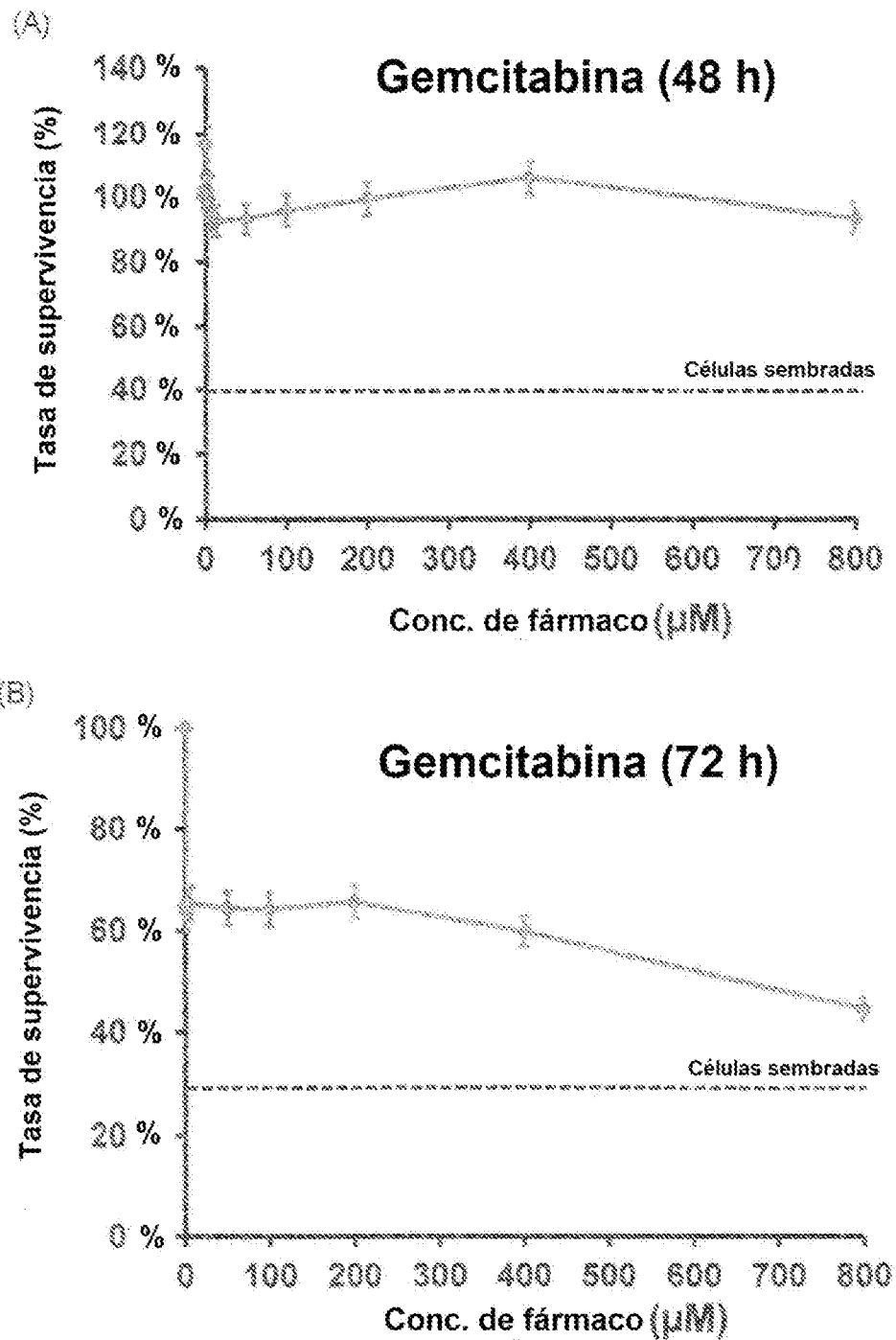


FIG. 5A-B

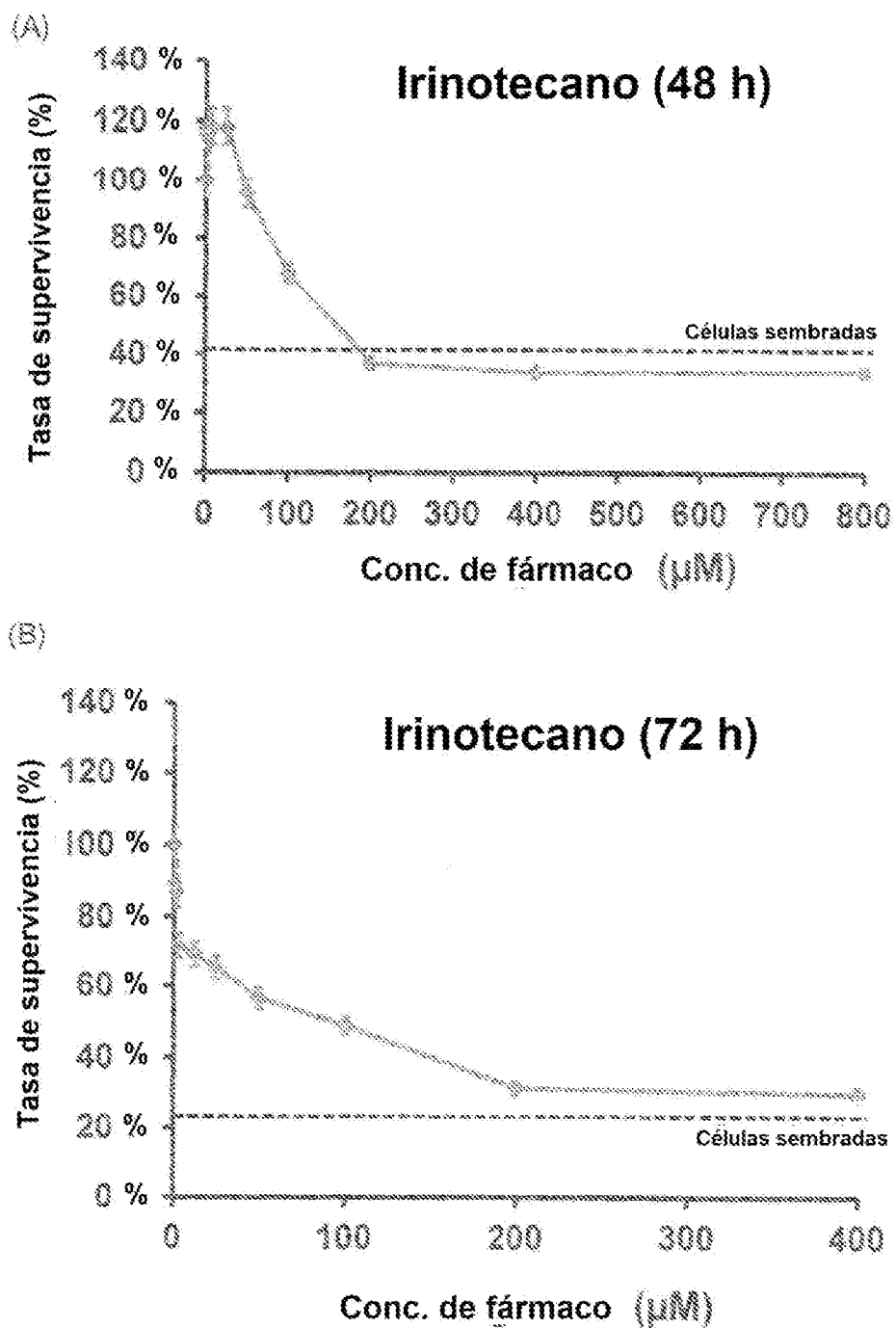


FIG. 6A-B

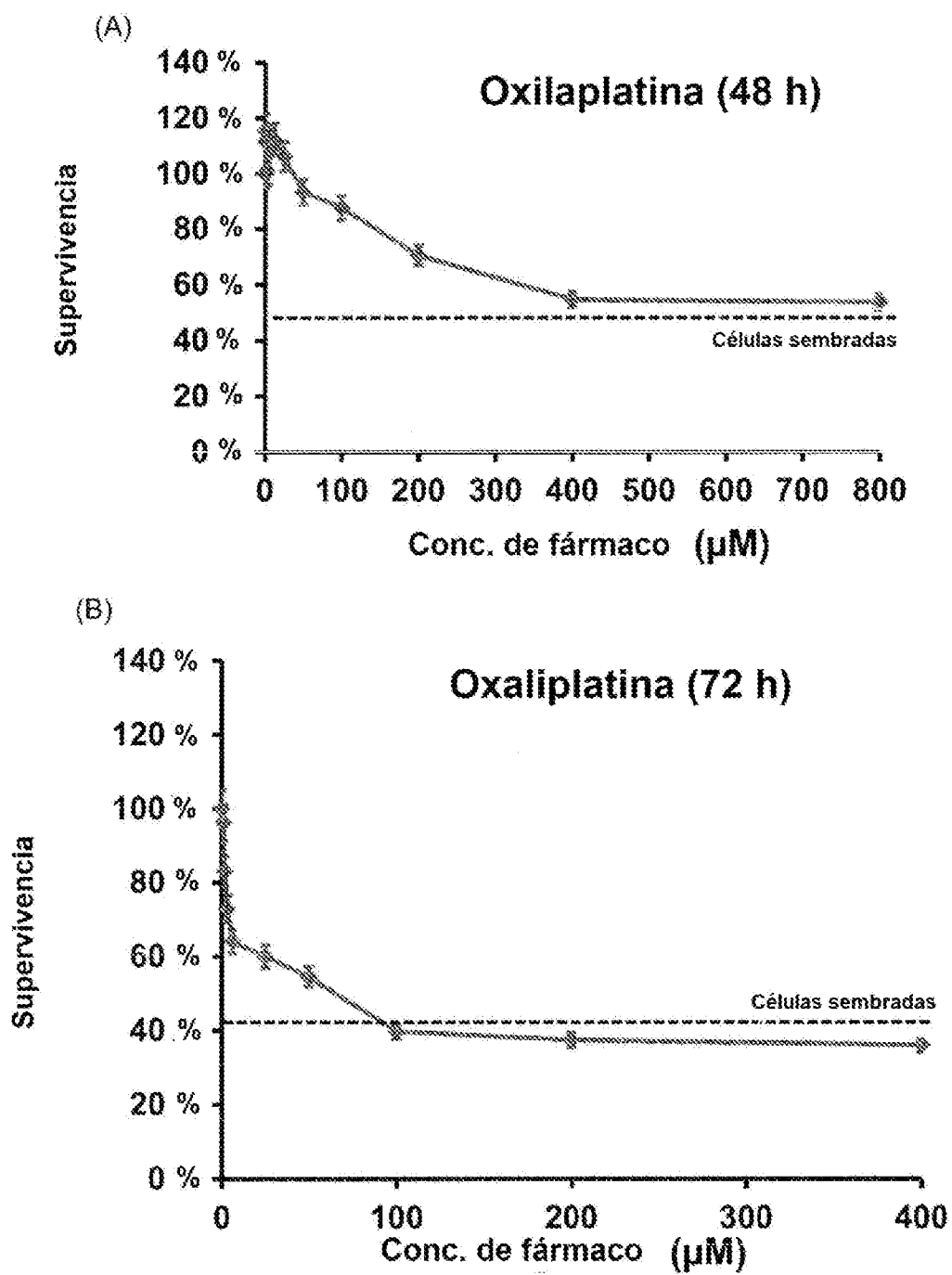


FIG. 7A-B

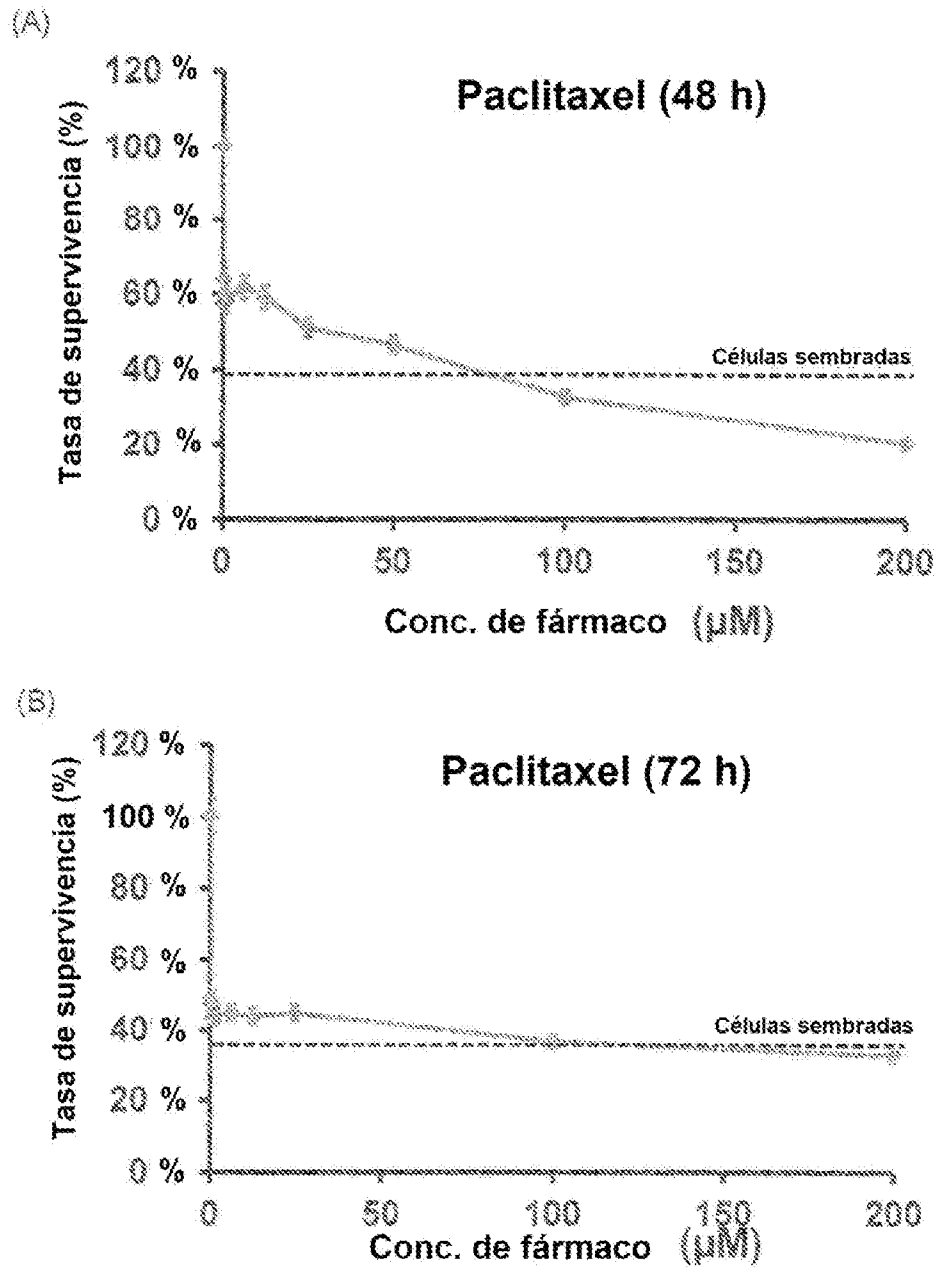


FIG. 8

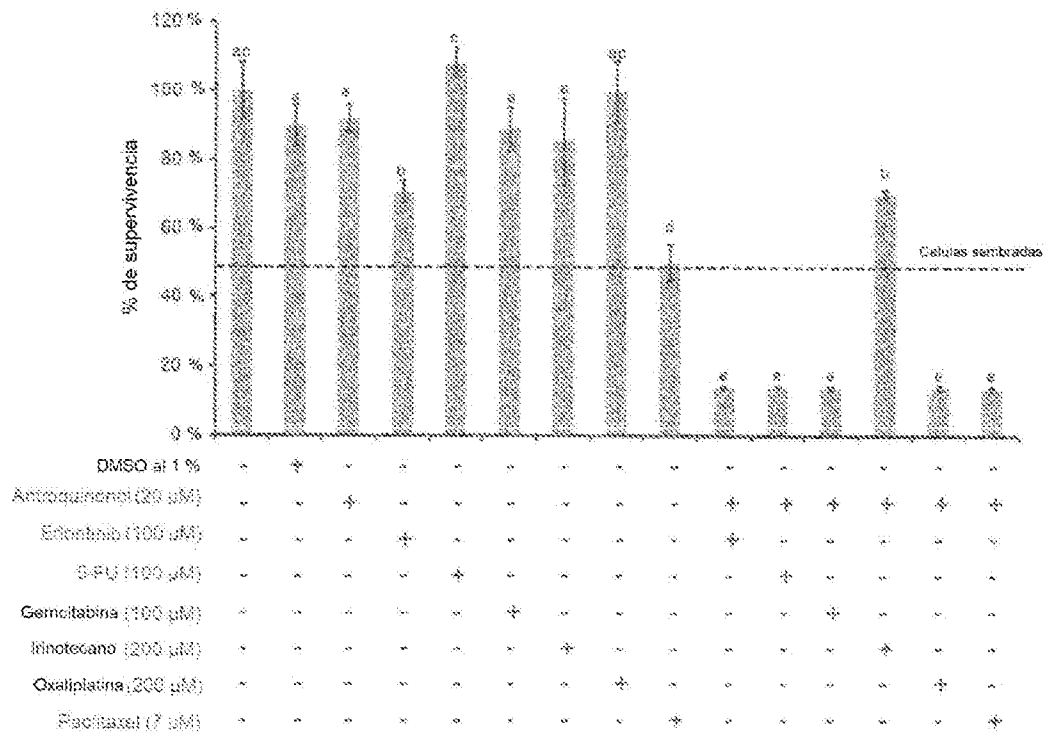


FIG. 9

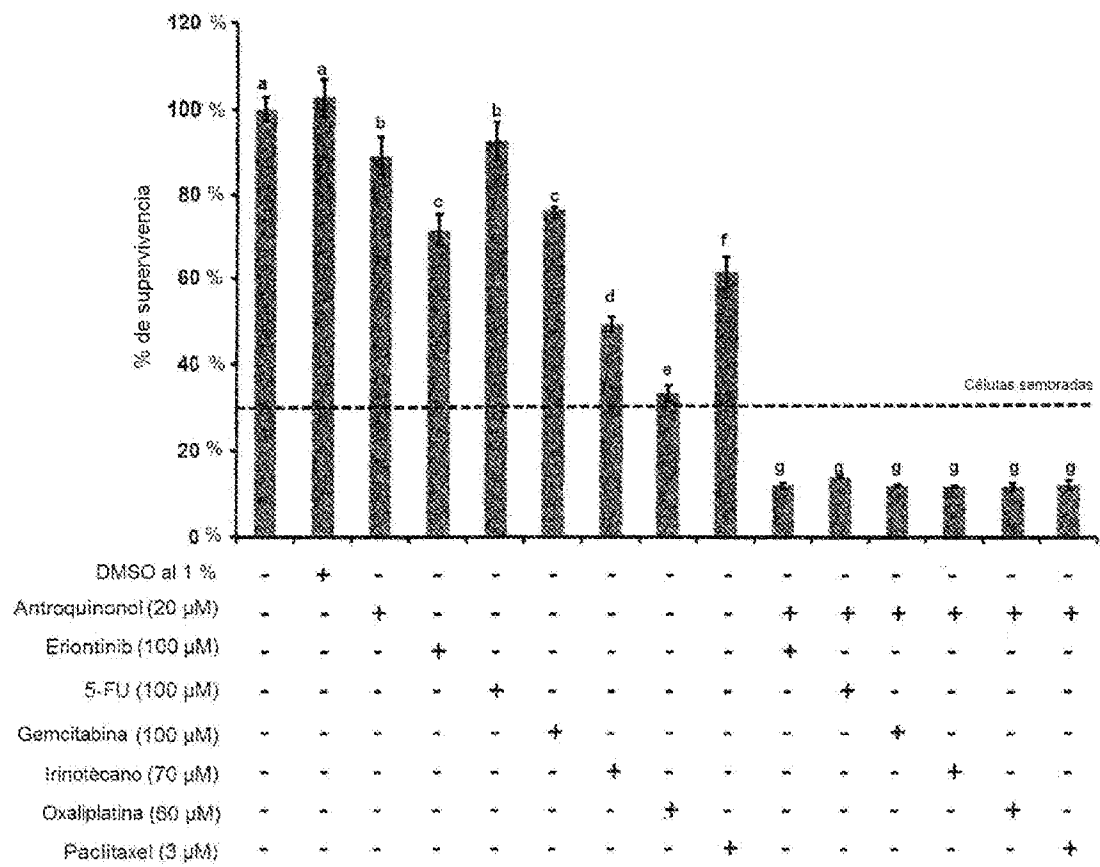


FIG. 10A-C

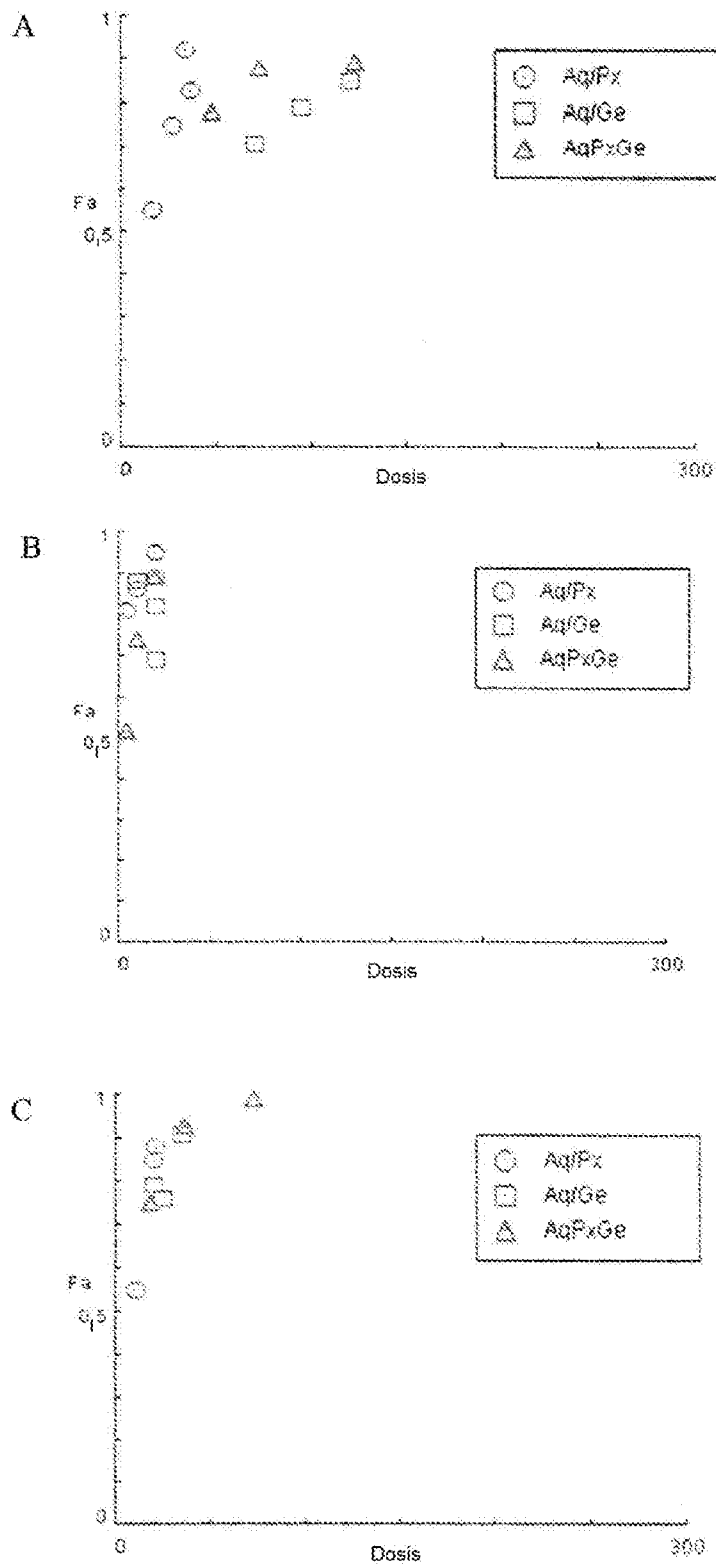


FIG. 11A-C

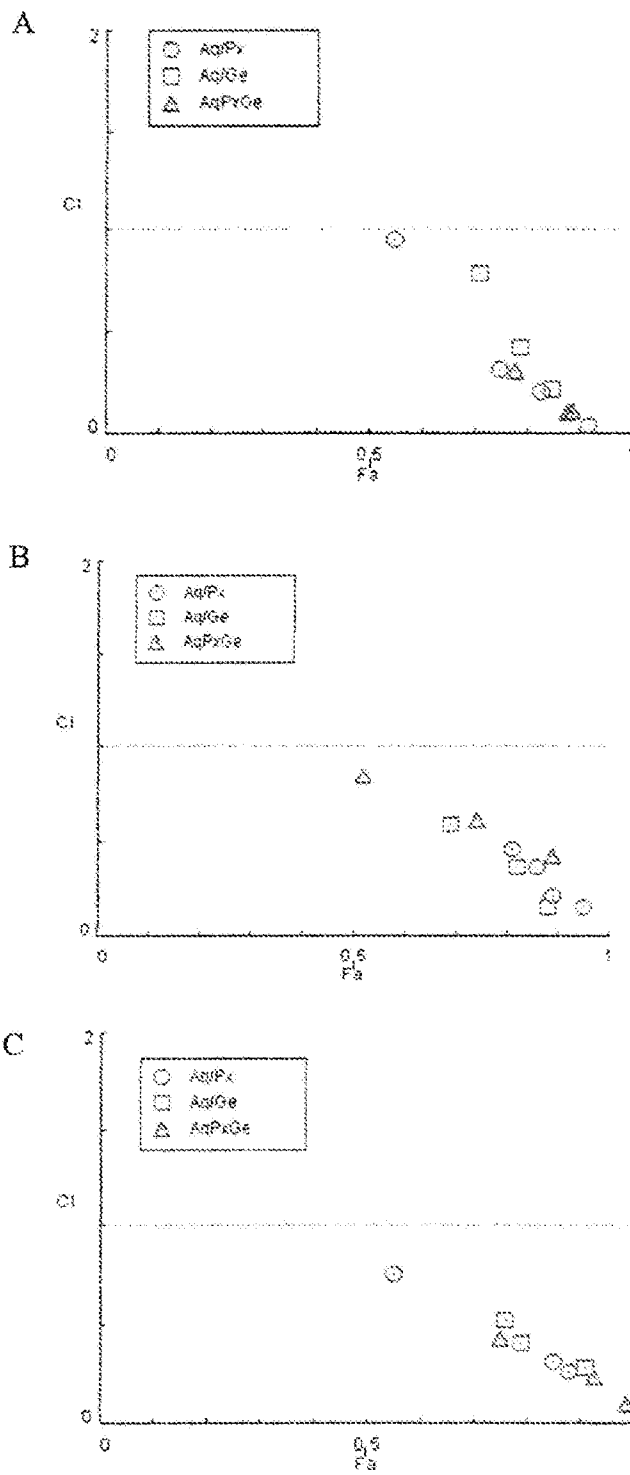


FIG. 12

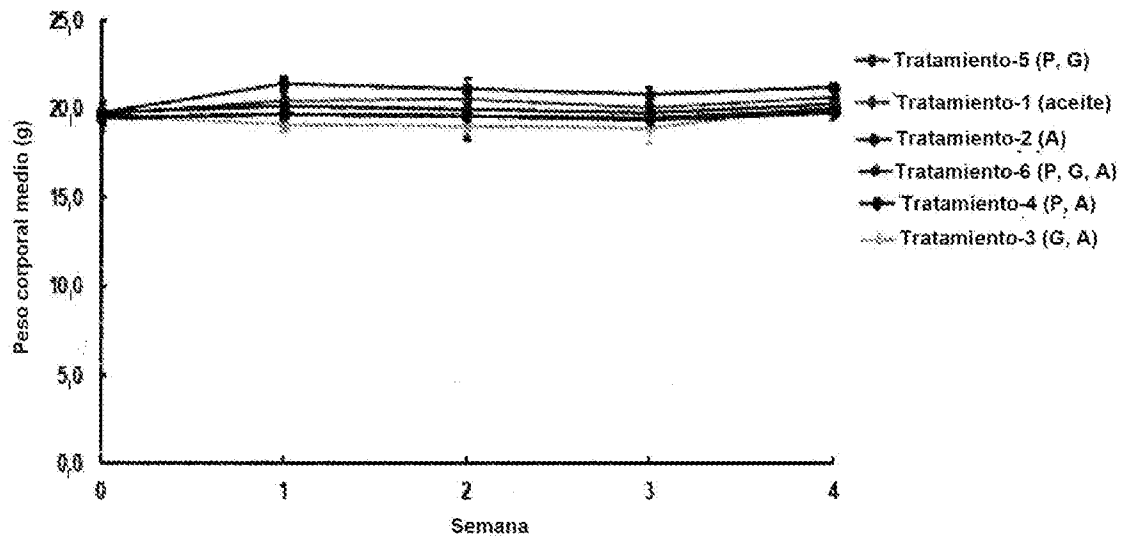


FIG. 13

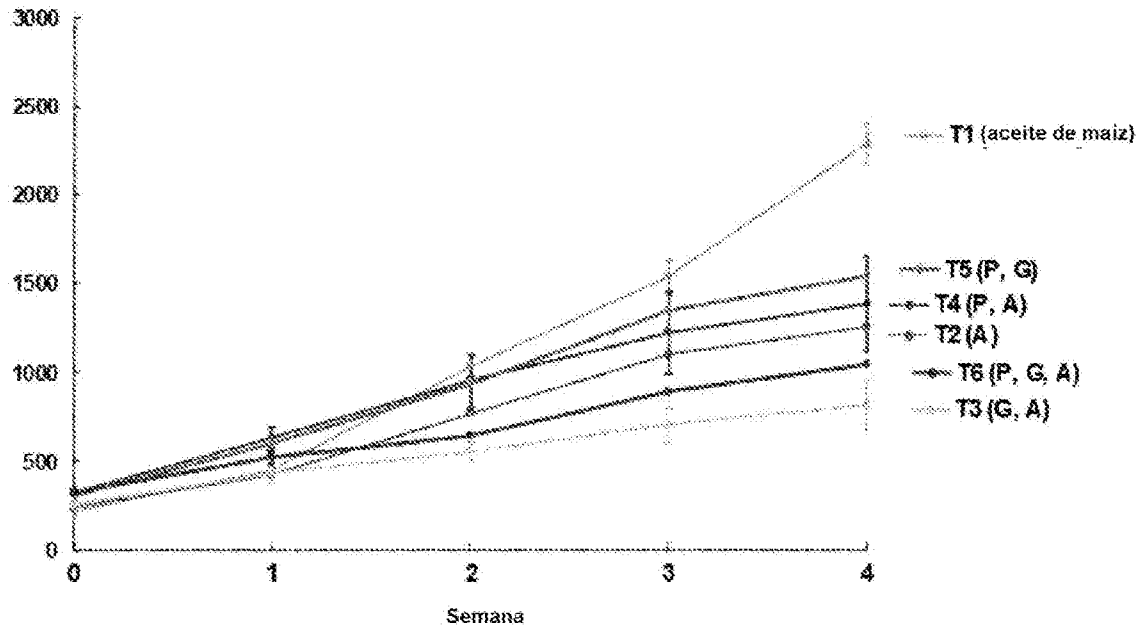


FIG. 14

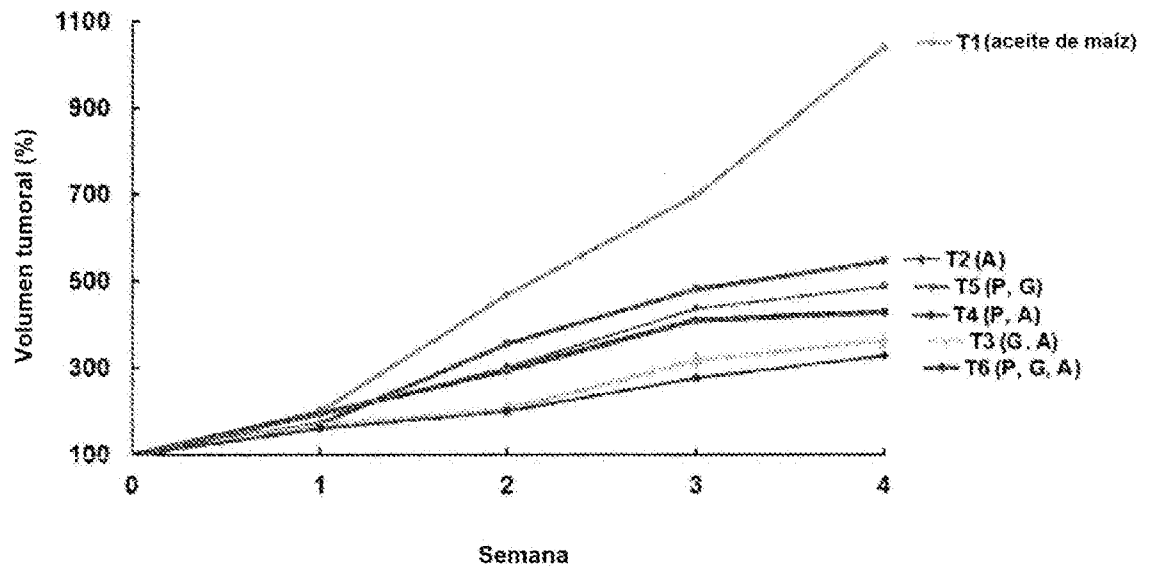


FIG. 15

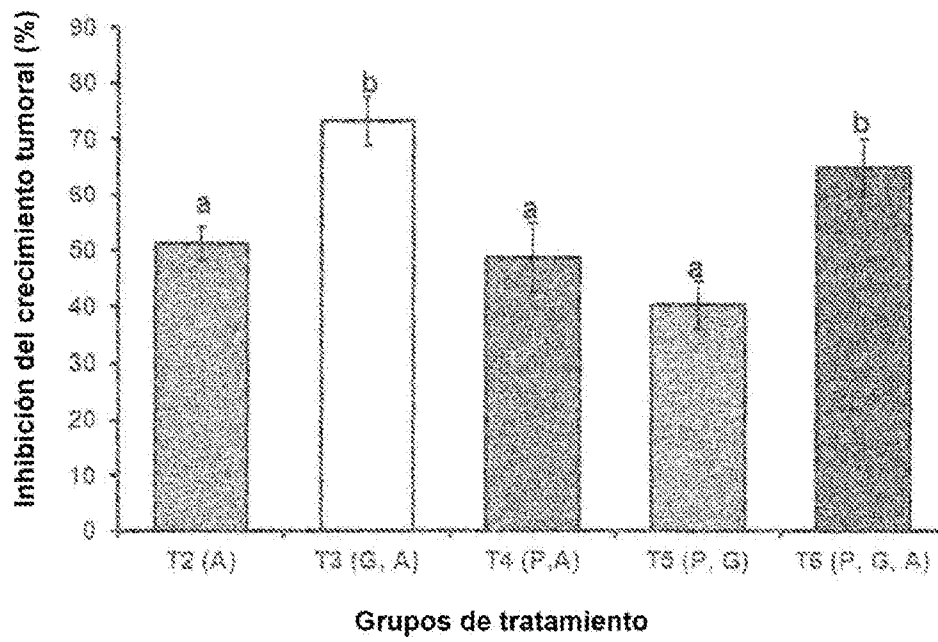


FIG. 16

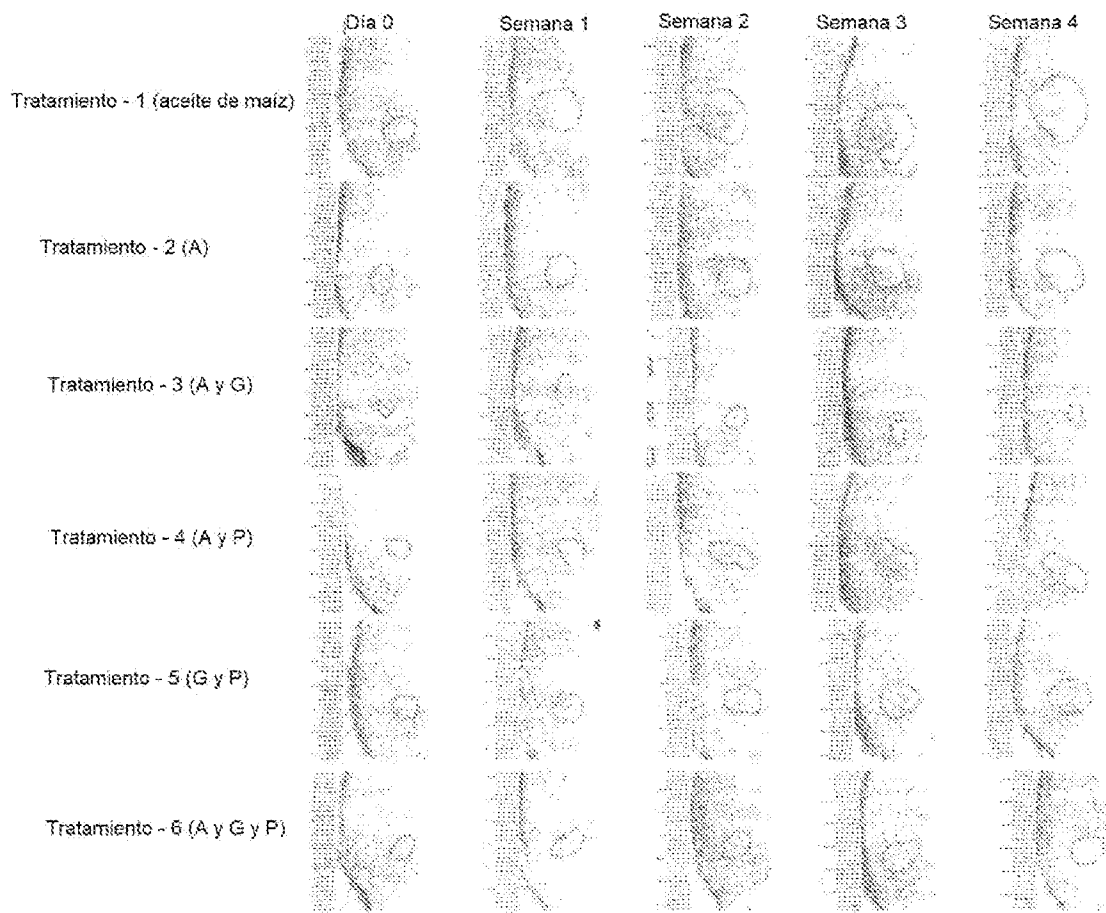


FIG. 17

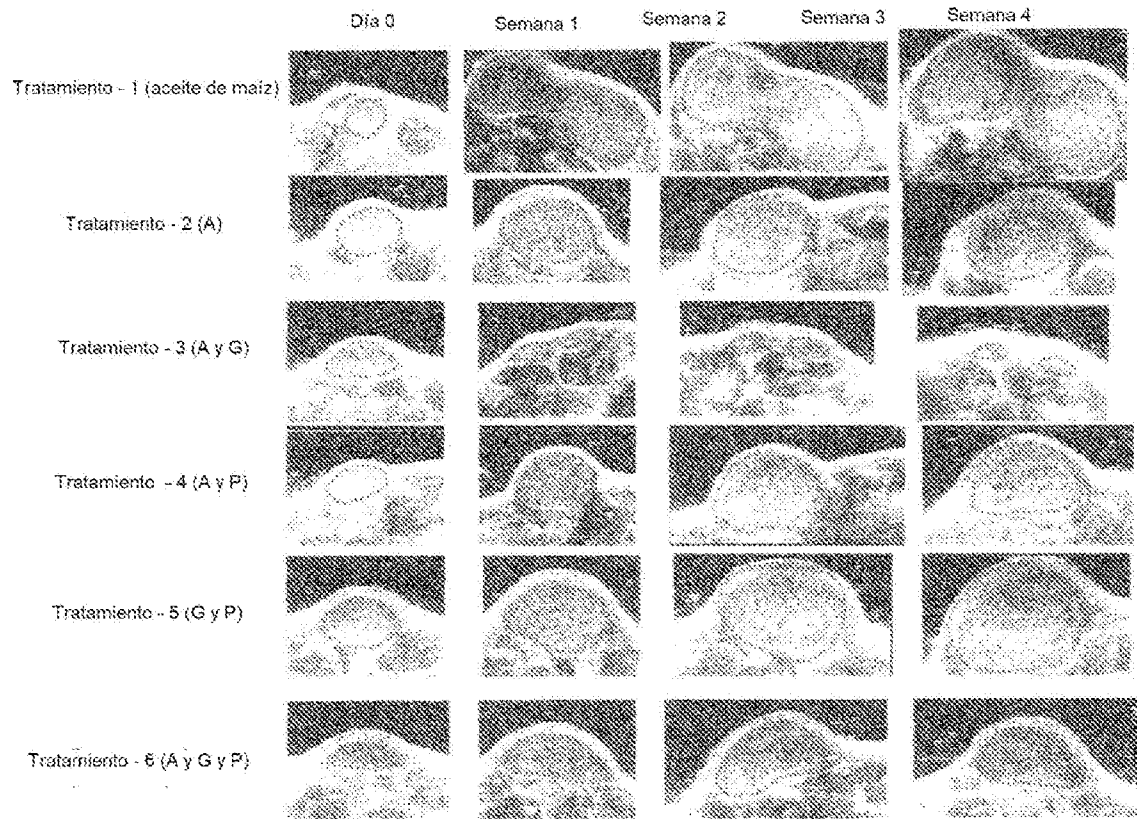
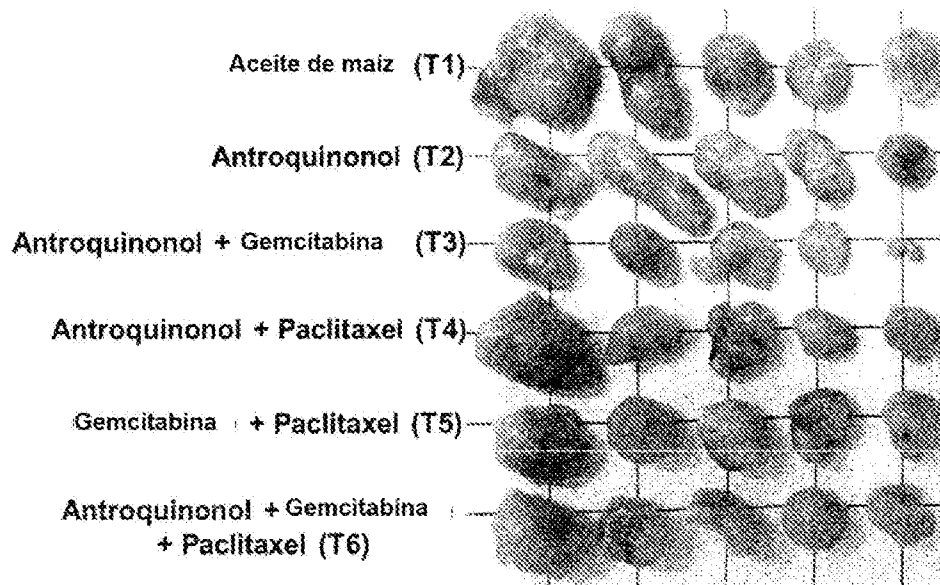
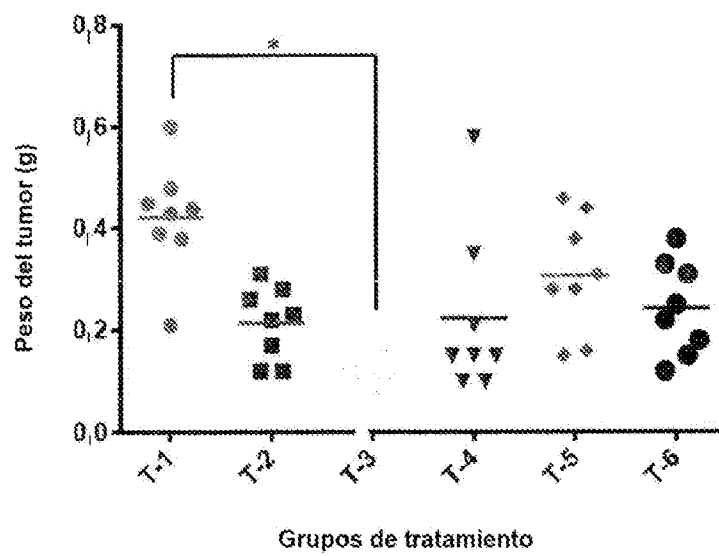


FIG. 18A-B



A



B

FIG. 19

