

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 799**

51 Int. Cl.:

A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2021** **PCT/EP2021/054039**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2021** **WO21165405**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2021** **E 21705541 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023** **EP 3989961**

54 Título: **Combinación farmacéutica de un compuesto de artemisinina, ácido 5-aminolevulinico o ácido metil-5-aminolevulinico y un agente quimioterapéutico**

30 Prioridad:

19.02.2020 EP 20158341

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2024

73 Titular/es:

JLP HEALTH GMBH (100.0%)
Himmelhofgasse 62
1130 Wien, AT

72 Inventor/es:

ELLING, ULRICH y
PENNINGER, JOSEF, MARTIN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 972 799 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

Combinación farmacéutica de un compuesto de artemisinina, ácido 5-aminolevulínico o ácido metil-5-aminolevulínico y un agente quimioterapéutico

5

Campo de la Invención

10

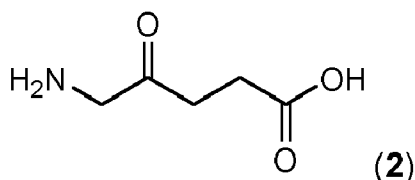
15

[0001] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de artemisinina seleccionado entre artemisinina, dihidroartemisinina o artesunato o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, y ácido 5-aminolevulínico o ácido metil-5-aminolevulínico o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones. Esta composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Preferentemente, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende artemisinina o dihidroartemisinina o artesunato y ácido 5-aminolevulínico o ácido metil-5-aminolevulínico y al menos un agente quimioterapéutico, como se define en las reivindicaciones para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer cerebral, en particular el glioblastoma.

20

[0002] Más preferentemente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende artemisinina (**1a**), artesunato (**1e**) o dihidroartemisinina (**1b**) y ácido 5-aminolevulínico (**2**) y al menos un agente quimioterapéutico, seleccionado del grupo que consiste en temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo, para su uso en profilaxis y/o tratamiento de cáncer cerebral, en particular glioblastoma.

25

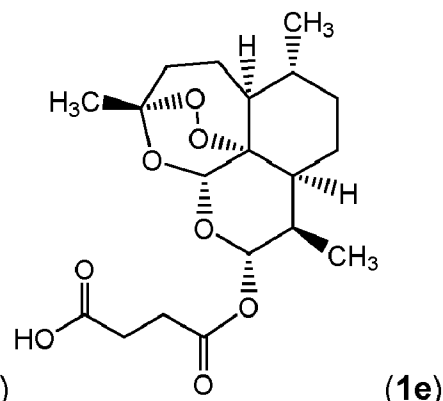
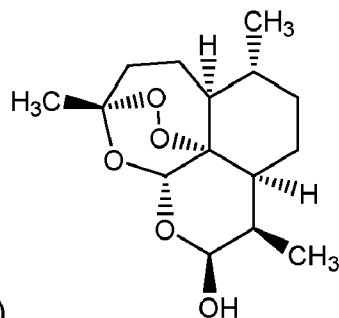
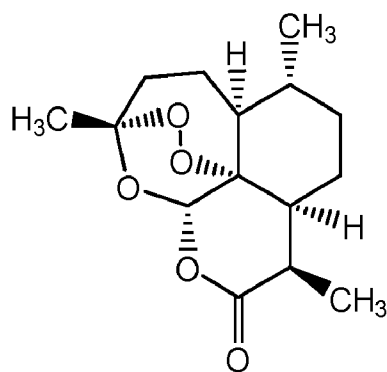


30

35

40

45

Antecedentes de la Invención

50

55

[0003] La artemisinina es un compuesto médico natural que puede aislarse de la planta *Artemisia annua*, o ajeno dulce. Esta sustancia se utiliza en la medicina tradicional china desde hace miles de años para tratar la fiebre, los resfriados y otros males. En la década de 1970, el científico chino Tu Youyou describió por primera vez la artemisinina como fármaco antipalúdico. Junto con sus derivados, la artemisinina es uno de los fármacos antipalúdicos más utilizados en todo el mundo. Mata al parásito unicelular *P. falciparum*, causante de la malaria, en todas sus fases de vida [Aweeka, F. T. & German, P. I. Farmacología clínica de las terapias combinadas basadas en la artemisinina. *Clinical Pharmacokinetics* 47, 91-102 (2008)}. Más recientemente, se han reconocido las potentes propiedades anticancerígenas de la artemisinina. La variedad de las distintas funciones de la artemisinina y sus aplicaciones apuntan hacia un amplio mecanismo de acción del compuesto en las células eucariotas.

60

65

[0004] La artemisinina es bioquímicamente un endoperóxido natural. Sus propiedades endoperóxidas son estrictamente necesarias para su efecto antipalúdico. Una vez escindido el puente endoperóxido, la artemisinina se activa y da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres que posteriormente alquilan proteínas y macromoléculas susceptibles en la célula. Esta reacción de alquilación altera la estructura y la función de las proteínas, daña el ADN e induce estrés celular, lo que acaba provocando la muerte celular. La artemisinina se asocia a una amplia gama de proteínas celulares de forma inespecífica y altera múltiples vías, como la glucólisis, la biosíntesis de proteínas, los procesos mitocondriales y las respuestas antioxidantes [Zhang, C.-J. et al. Focalización promiscua activada por hemo

de la artemisinina en *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications* 6, 1-11 (2015)} {Ismail, H. M. et al. Las sondas basadas en la actividad de la artemisinina identifican múltiples dianas moleculares en la fase asexual del parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*3D7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 2080-2085 (2016)}, en paralelo. Aunque todavía se está debatiendo sobre los reguladores o activadores definitivos de la artemisinina, el hierro libre o complejo, como en el hemo de la hemoglobina, se consideran los candidatos más fuertes. Las promiscuas propiedades de unión de la artemisinina, junto con el elevado número de funciones notificadas, han dificultado hasta ahora la identificación de sus dianas celulares definidas {Tilley, L., Straimer, J., Gnädig, N. F., Ralph, S. A. & Fidock, D. A. Acción de la artemisinina y resistencia en *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 32, 682-696 (2016)}. A medida que aumenta el número de casos de malaria resistente a la artemisinina, es imperativo delinear el mecanismo de acción de los compuestos, con el fin de ampliar su aplicabilidad como remedio médico.

[0005] El ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) es un intermediario en la biosíntesis del hemo y un marcador tumoral que se utiliza para marcar tumores para la cirugía. Es un aminoácido no proteico.

[0006] Se informa de la citotoxicidad específica de la Artemisinina contra las células de cáncer colorrectal (CRC). Jigang Wang *et. al* demuestran que la terapia combinada de artemisinina y ácido aminolevulínico resulta más eficaz que la monoterapia con artemisinina en un modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal (CRC) (*ACS Cent. Sci.* 2017, 3; pp 743-750).

[0007] El glioblastoma, también conocido como glioblastoma multiforme (GBM), es el cáncer más agresivo que se origina en el cerebro. Los glioblastomas representan el 15% de los tumores cerebrales. Pueden comenzar a partir de células cerebrales normales o desarrollarse a partir de un astrocitoma de bajo grado ya existente. Normalmente, el tratamiento consiste en cirugía, tras la cual se utiliza quimioterapia y radioterapia. Es el cáncer más frecuente que se origina en el cerebro y el segundo tumor cerebral más frecuente, después del meningioma. Aproximadamente tres de cada 100.000 personas desarrollan la enfermedad al año. Suele comenzar en torno a los 64 años y es más frecuente en hombres que en mujeres.

[0008] A pesar del tratamiento máximo, el glioblastoma suele reaparecer. La duración típica de la supervivencia tras el diagnóstico es de 12 a 15 meses, con menos del 3 al 7% de personas que sobreviven más de cinco años. Sin tratamiento, la supervivencia suele ser de tres meses. Un tratamiento eficaz del glioblastoma sigue siendo muy demandado.

[0009] Por lo tanto, es el objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica útil para la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer y especialmente del glioblastoma.

[0010] El objetivo de la presente invención se resuelve mediante la enseñanza de las reivindicaciones independientes. Otras características ventajosas, aspectos y detalles de la invención son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes, la descripción, las figuras y los ejemplos de la presente solicitud.

[0011] Sorprendentemente, se descubrió en la presente invención que una composición farmacéutica que comprende un compuesto de artemisinina y ácido 5-aminolevulínico o ácido metil-5-aminolevulínico y al menos un agente quimioterapéutico, como se define en las reivindicaciones, es útil para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres seleccionados entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas y especialmente de glioblastoma.

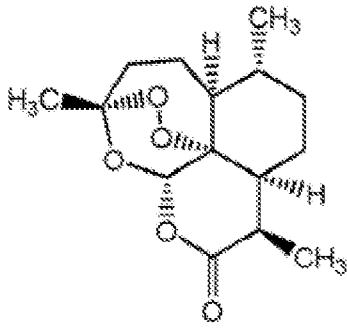
[0012] Dicha composición farmacéutica puede comprender además un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, dicha composición farmacéutica se utiliza en combinación con radioterapia, inmunoterapia, terapia de campo electromagnético y/o terapia de hipertermia.

Resumen de esta invención

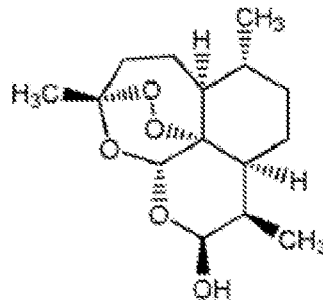
[0013] La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina(1) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (2), ácido metil-5-aminolevulínico (2b), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, preferentemente un fármaco antiglioblastoma.

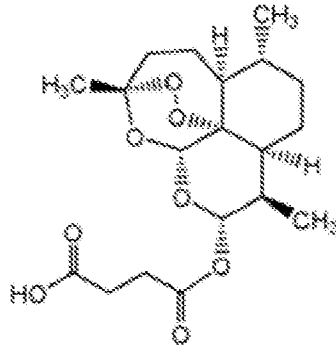
[0014] El compuesto de artemisinina (1) se selecciona entre



artemisinina (1a)



arteminol (1b, dihidroartemisinina)



artesanato (1e)

Y

o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de este compuesto de artemisinina(1).

[0015] El agente quimioterapéutico y preferiblemente el fármaco antiglioblastoma se selecciona del grupo que consiste en temozolomida, lomustina, cisplatino, 5-fluorouracilo.

[0016] Las composiciones farmacéuticas aquí divulgadas son útiles como medicamentos y especialmente para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas y preferiblemente cáncer cerebral.

[0017] Preferiblemente, el glioblastoma se selecciona entre los subtipos proneural (PN), mesenquimal (MES) y glioblastoma clásico (CL).

[0018] Para uso en profilaxis y/o tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático y cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer pulmonar tal como cáncer pulmonar de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, una relación molar del compuesto de artemisinina y el ácido 5-aminolevulínico o el ácido metil-5-aminolevulínico está preferiblemente en un intervalo de 1:5 a 1:5000, más preferiblemente 1:5 a 1:1000, aún más preferiblemente 1:10 a 1:500 en la composición farmacéutica.

[0019] Opcionalmente, para su uso en profilaxis y/o tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, la composición farmacéutica comprende además portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptables.

[0020] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma preferiblemente en combinación con una radioterapia, inmunoterapia, terapia de campo electromagnético, terapia de hipertermia, quimioterapia, inmunoterapia del cáncer y/o cualquier otra terapia basada en moléculas pequeñas.

[0021] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se utiliza en forma de comprimido, cápsula, jarabe, solución, suspensión, emulsión o gel.

[0022] En algunas realizaciones, para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, la composición farmacéutica se administra por vía oral o parenteral. Preferiblemente, la aplicación parenteral incluye la aplicación intradérmica, intragastral, intracutánea, intravascular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, tópica y transdérmica.

[0023] En algunas realizaciones, para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático y cáncer de hígado y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente glioblastoma, la artemisinina contenida en la composición farmacéutica se administra en un intervalo de 0,01 a 100 mg/kg por peso corporal y día y el ácido 5-aminolevulínico se administra en un intervalo de 0,01 a 200 mg/kg por peso corporal y día.

[0024] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento del glioblastoma preferentemente en combinación con el al menos un agente quimioterapéutico, preferentemente un fármaco antiglioblastoma, en el que el al menos un agente quimioterapéutico, preferentemente el al menos un fármaco antiglioblastoma se administra en un intervalo de 0,01 a 100 mg/kg por peso corporal y día.

Descripción de la invención

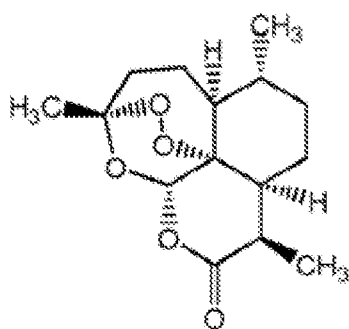
[0025] Nótese que las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

[0026] La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende

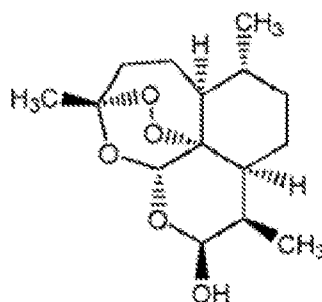
- a) un compuesto de artemisinina (**1**) o una sal farmacéuticamente aceptable, cocrystal o solvato del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, preferentemente un fármaco antiglioblastoma.

[0027] Se descubrió sorprendentemente que las composiciones farmacéuticas aquí divulgadas que contienen tres ingredientes farmacéuticamente activos, a saber, un compuesto de artemisinina (**1**) y ácido 5-aminolevulínico (**2**) o ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**) y al menos un agente quimioterapéutico, preferentemente el al menos un fármaco contra el glioblastoma, son considerablemente más eficaces que las combinaciones de sólo dos de estos ingredientes activos, como se evidencia en las Figuras 13 a 19.

[0028] El término >>compuesto de artemisinina<< se utiliza en el presente documento para referirse a la artemisinina (**1a**), la dihidroartemisinina (**1b**) y el artesunato (**1e**), como se muestra a continuación, y a las sales, cocrystal o solvatos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de artemisinina (**1**).

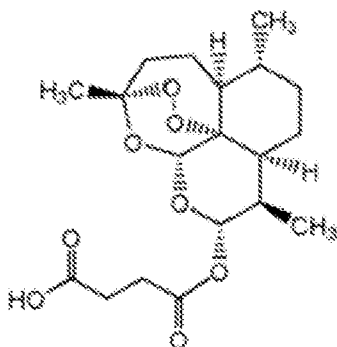


artemisinina (**1a**)



arteminol (**1b**, dihidroartemisinina)

60 y



artesunato (1e)

5
10
15

[0029] En todas las composiciones farmacéuticas aquí divulgadas, la artemisinina (1a), la dihidroartemisinina (1b) y el artesunato (1e) se prefieren como compuesto de artemisinina (1). Los más preferidos son la artemisinina (1a) y el artesunato (1e) y el más preferido es la artemisinina (1a).

[0030] Así, la presente solicitud se refiere preferentemente a una composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina (1) seleccionado del grupo que consiste en artemisinina (1a), dihidroartemisinina (1b) y artesunato (1e), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (2), ácido metil-5-aminolevulínico (2b), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

[0031] Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

- a) artemisinina (1a) o artesunato (1e), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (2), ácido metil-5-aminolevulínico (2b), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

[0032] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

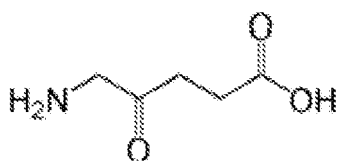
- a) artesunato (1e) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (2), ácido metil-5-aminolevulínico (2b), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

[0033] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

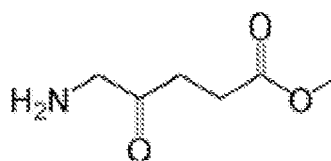
- a) artemisinina (1a) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma;
- b) ácido 5-aminolevulínico (2), ácido metil-5-aminolevulínico (2b), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

[0034] En cuanto al componente b), se prefiere el ácido 5-aminolevulínico (2) al ácido metil-5-aminolevulínico (2b).

55



Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)



Ácido metil-5-aminolevulínico (MAL)

60
65

[0035] En consecuencia, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina (1) seleccionado del grupo formado por artemisinina (1a), dihidroartemisinina (1b) y

artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

5 **[0036]** Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

10

[0037] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

15

[0038] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

20

[0039] El agente quimioterapéutico, preferiblemente el fármaco antiglioblastoma, se selecciona del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo.

25

[0040] El fármaco anit-glioblastoma se selecciona del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

[0041] Los datos preliminares (no reivindicados) han indicado que la combinación de artemisinina y ácido 5-aminolevulínico y triptolida u homoharringtonina o dactinomicina o doxorubicina o epirrubicina o vinorebina es comparable a la combinación de artemisinina y ácido 5-aminolevulínico y temozolomida.

30

[0042] Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo que consiste en artemisinina (**1a**), dihydroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina. La más preferida es la temozolomida.

35

40

[0043] Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

45

50 **[0044]** Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

55

[0045] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

60

65

[0046] Además, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo que consiste en artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
 b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
 c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

[0047] Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos;
 b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
 c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

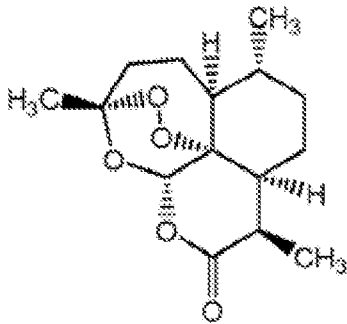
[0048] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
 b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
 c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

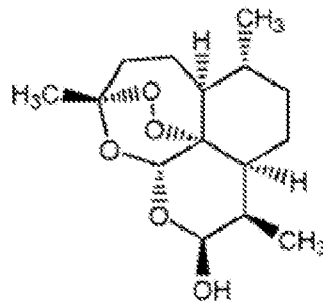
[0049] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende

a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma;
 b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
 c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La más preferida es la temozolomida.

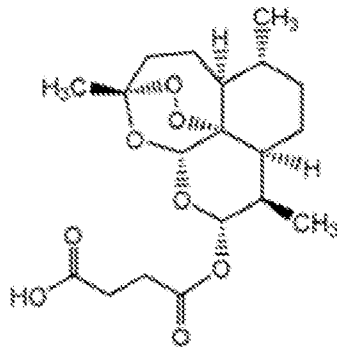
[0050] Como se utiliza en el presente documento, los términos "**compuesto de artemisinina**" significan un compuesto seleccionado del grupo que comprende o consiste en artemisinina (ART o Art o **1a**), artesunato (ARS o **1e**) y dihidroartemisinina (arteminol o DHA o **1b**).



artemisinina (**1a**)



arteminol (**1b**, dihidroartemisinina)



artesunato (**1e**)

[0051] El metabolito activo del compuesto de artemisinina (1) en general es la dihidroartemisinina (DHA). En el presente documento, los términos "artemisinina", "ART", "Art" se utilizan indistintamente y abarcan un compuesto bien conocido que tiene la estructura química (1a).

5 **[0052]** Tal como se utiliza aquí, y a menos que se especifique lo contrario, el término "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) de un compuesto de artemisinina (1)", incluye, pero no se limita a, sales de moléculas ácidas o básicas de compuestos descritos aquí. Las moléculas básicas son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden utilizarse para preparar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición ácida no tóxicas, por ejemplo, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, acético, fórmico, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, oleico, tánico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico, glucónico, glucarónico, sacárico, isonicotínico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico o pamónico (p. ej., ácido 1,1'-mico, ácido 1,1'-sulfónico).g, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen, entre otros, los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, fosfórico o nítrico. Los compuestos que incluyen una fracción de amina pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con diversos aminoácidos, además de los ácidos mencionados anteriormente. Las moléculas químicas de naturaleza ácida son capaces de formar sales básicas con diversos cationes farmacológicamente aceptables. Ejemplos de tales sales son las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos y, en particular, las sales de calcio, magnesio, sodio, litio, zinc, potasio o hierro.

20 **[0053]** Tal como se utiliza aquí, y a menos que se especifique lo contrario, el término "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) del ácido 5-aminolevulínico (2)" o "sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) del ácido metil-5-aminolevulínico (2b)", incluye, pero no se limita a, sales de moléculas ácidas o básicas de los compuestos descritos aquí. Las moléculas básicas son capaces de formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que pueden utilizarse para preparar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición ácida no tóxicas, por ejemplo, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, acético, fórmico, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, oleico, tánico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico, glucónico, glucarónico, sacárico, isonicotínico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, bencenosulfónico o pamónico (p. ej., ácido 1,1'-mico, ácido 1,1'-sulfónico).g, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen, entre otros, los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, fosfórico o nítrico. Los compuestos que incluyen una fracción de amina pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con diversos aminoácidos, además de los ácidos mencionados anteriormente. Las moléculas químicas de naturaleza ácida son capaces de formar sales básicas con diversos cationes farmacológicamente aceptables. Ejemplos de tales sales son las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos y, en particular, las sales de calcio, magnesio, sodio, litio, zinc, potasio o hierro.

35 **[0054]** Tal como se utiliza aquí, y a menos que se especifique lo contrario, el término "cocrystal(es)", "cocrystal(es) farmacéuticamente aceptable(s) de compuesto de artemisinina", son materiales cristalinos compuestos de dos o más moléculas diferentes, es decir, compuesto de artemisinina como ingrediente farmacéutico activo (IFA) y formadores de cocrystal ("coformadores"), en la misma red cristalina.

40 **[0055]** El cocrystal es una formación de enlace principalmente de hidrógeno entre la molécula del fármaco y el coformador, por lo que el API, independientemente de los grupos ácidos, básicos o ionizables, podría potencialmente cocrystalizarse. La cocrystalización puede mejorar propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, la velocidad de disolución, la estabilidad química y el punto de fusión. Entre las interacciones responsables de la formación de cocrystal se encuentran los enlaces de hidrógeno, el apilamiento π y las fuerzas de Van der Waals.

45 **[0056]** El coformador preferido del cocrystal del compuesto de artemisinina puede incluir, entre otros, nicotinamida, ácido ascórbico, urea, trometamina, teofilina, teofilina-7-ácido acético, teobromina, sulfamida, sacarosa, sorbitol, sacarina, piridoxina, clorogluconol, paracetamol, N-metilglucosamina, ácido metanosulfónico, D-manitol, ácido malónico.

50 **[0057]** Tal como se utiliza aquí, y a menos que se especifique lo contrario, el término "solvato" significa un compuesto que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. El disolvente puede incluir, entre otros, alcoholes como etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, glicol, N-metil-2-pirrolidona, acetonitrilo, N,N'-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, agua. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

55 **[0058]** En el presente documento, los términos "ácido 5-aminolevulínico", "ácido delta-aminolevulínico", "ALA" y "5-ALA" se utilizan indistintamente y abarcan el ácido 5-amino-4-oxopentanoico de estructura química(2).

60 **[0059]** En los seres humanos, el ácido 5-aminolevulínico es un precursor del hemo. El ácido 5-aminolevulínico pasa por una serie de transformaciones en el citosol y finalmente se convierte en protoporfirina IX dentro de la mitocondria. Esta molécula de protoporfirina se quela con el hierro en presencia de la enzima ferroquelatasa para producir hemo. Así pues, la administración de ácido 5-aminolevulínico puede utilizarse para aumentar los niveles intracelulares de hemo y las concentraciones intracelulares de hierro. El ácido 5-aminolevulínico puede administrarse como tal o en cualquier forma

física farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el ácido 5-aminolevulínico puede estar en forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable.

5 **[0060]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**sales farmacéuticas de ácido 5-aminolevulínico**" se derivará típicamente de ALA o un derivado de ALA y un ácido monoprótico, por ejemplo, un ácido sulfónico como el ácido metanosulfónico, formando así una sal 1:1. Alternativamente, pueden formarse sales entre ALA o un derivado de ALA y un ácido di- o tri-prótico, por ejemplo, un ácido sulfónico como el ácido etano-1, 2-disulfónico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. En el caso de que se utilice un ácido con más de un protón ácido, el compuesto resultante puede tener una relación estequiométrica distinta de 1:1, por ejemplo 2:1 (ALA:ácido) o 3:1 (ALA:ácido), o puede comprender una mezcla de sales con distintos niveles de estequiometría. En el caso del ácido sulfúrico, por ejemplo, puede formarse una sal 2:1 (ALA:ácido), mientras que en el caso del ácido fosfórico puede formarse una sal 3:1 (ALA:ácido). Los ácidos polipróticos también son capaces de formar otras sales con ALA o un derivado de ALA. El ácido sulfúrico, por ejemplo, puede proporcionar una sal 1:1 (ALA: ácido) basada en el anión HSO_4^- y el ácido fosfórico puede proporcionar una sal 2:1 (ALA: ácido) y 1:1 (ALA: ácido) (o una combinación de las mismas) basada en los aniones HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , respectivamente. 10
15 Además, los ácidos polipróticos también pueden formar otras sales, por ejemplo, sales 1:1, con ALA o sus derivados (por ejemplo, con ésteres de ALA) en forma de sales con otras bases fisiológicamente aceptables, como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio y meglumina. Las sales según la invención derivan preferentemente de un ácido que tiene un pKa de aproximadamente 4 o menos, más preferentemente de aproximadamente 3 o menos. El ácido puede ser inorgánico u orgánico. Los ácidos inorgánicos preferidos son el ácido bromhídrico, el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico y el ácido nítrico. Los ácidos orgánicos preferidos incluyen el ácido sulfónico y sus derivados. Se prefieren especialmente las sales derivadas de ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfónico y derivados del ácido sulfónico. El término "ácido sulfónico" incluye cualquier compuesto orgánico que contenga al menos un grupo $-\text{SO}_3\text{H}$. Preferentemente, puede comprender 1, 2 ó 3 grupos $-\text{SO}_3\text{H}$, más preferentemente 1 ó 2, por ejemplo 1. Cuando se utiliza en relación con el ácido sulfónico, el término "derivados" pretende abarcar cualquier compuesto de este tipo que contenga 20
25 al menos un grupo (preferiblemente 1, 2 o 3, más preferiblemente 1 o 2, por ejemplo 1) $-\text{SO}_3\text{X}$ (donde X es un catión fisiológicamente tolerable, como un catión sódico, cálcico, potásico, magnésico o meglumínico).

30 **[0061]** Tal como se utiliza aquí, el término "**tratar**" o "**tratamiento**" abarca revertir, aliviar o inhibir el progreso de una enfermedad, trastorno o afección, o la mejora de uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o afección, a los que se aplica dicho término. Como se utiliza en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" también puede referirse a la disminución de la probabilidad o incidencia de la aparición de una enfermedad, trastorno o afección en un mamífero en comparación con una población de control no tratada, o en comparación con el mismo mamífero antes del tratamiento. Por ejemplo, tal como se utiliza aquí, "tratar" puede referirse a prevenir una enfermedad, trastorno o afección, y puede incluir retrasar o prevenir la aparición de una enfermedad, trastorno o afección, o retrasar o prevenir los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección. Tal como se utiliza en el presente documento, "tratar" también puede referirse a reducir la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección o los síntomas asociados a dicha enfermedad, trastorno o afección antes de que un mamífero padezca la enfermedad, trastorno o afección. Dicha prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad, trastorno o afección antes de la afección se refiere a la administración de la composición de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, a un sujeto que no está en el momento de la administración afligido por la enfermedad, trastorno o afección. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" también puede referirse a prevenir la recurrencia de una enfermedad, trastorno o afección o de uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad, trastorno o afección. Los términos "tratamiento" y "terapéuticamente", tal y como se utilizan aquí, se refieren al acto de tratar, tal y como se define "tratar" más arriba.

45 **[0062]** Preferiblemente, una enfermedad, trastorno es un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer de barina, en particular glioblastoma.

50 **[0063]** El término "**cantidad eficaz**", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de un requerido para un cáncer seleccionado de entre los cánceres hematopoyéticos, el cáncer cerebral, el cáncer de páncreas, el cáncer de hígado, el cáncer de mama y el cáncer de pulmón, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente el cáncer cerebral, en particular el glioblastoma, en relación con un paciente no tratado. La cantidad eficaz de compuesto(s) activo(s) utilizado(s) en la práctica de la presente invención para el tratamiento terapéutico de una enfermedad varía en función de la forma de administración, la edad, el peso corporal y el estado general de salud del sujeto. En última instancia, el médico o veterinario que le atienda decidirá la cantidad y la pauta de dosificación adecuadas. Dicha cantidad se denomina cantidad "efectiva".

60 **[0064]** El término "**paciente**" o "**sujeto**", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sujeto mamífero (primates (p. ej. humanos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares), preferiblemente un sujeto humano, que tiene, se sospecha que tiene, o es o puede ser susceptible de tener una afección asociada con un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, en particular glioblastoma. En una realización, el presente método puede utilizarse para tratar a un paciente que sufre de esclerosis múltiple, por ejemplo, con cualquier síntoma como se ha comentado anteriormente. En otra realización, el presente método también puede utilizarse para evitar que un paciente en perspectiva contraiga un glioblastoma.

[0065] El glioblastoma, también conocido como glioblastoma multiforme (GBM), es el cáncer más agresivo que se origina en el cerebro. El glioblastoma tiene los subtipos proneural (PN), mesenquimal (MES) y clásico (CL). Por lo tanto, en una realización, el glioblastoma se selecciona preferentemente entre los subtipos proneural (PN), mesenquimal (MES) y glioblastoma clásico (CL).

[0066] El solicitante realizó un cribado para identificar dianas de la artemisinina en células madre murinas haploides (haESC) utilizando mutagénesis en todo el genoma [Figura 1A]. Para establecer las condiciones de cribado, el solicitante determinó los valores LD del compuesto en haESC de tipo salvaje y evaluó las tasas de crecimiento en diferentes líneas celulares tumorales murinas [Figura 5A, 5B]. Para la generación de bibliotecas de ESC mutantes de todo el genoma, el solicitante utilizó dos sistemas de selección para la mutagénesis insercional: Retrovirus and Tol2 transposons {Schnütgen, F. et al. Mejora de la captura de genes en células madre embrionarias de ratón. *Nucleic Acids Research* 36, e133-e133 (2008)}. La selección de esas bibliotecas independientes condujo a la recuperación de colonias resistentes a la artemisinina a partir de los grupos de células mutagenizadas, pero no a partir de las células de control. Tras la expansión y el mapeo de sus sitios de inserción, se determinaron las puntuaciones de enriquecimiento basadas en el análisis de pérdida de función (LOF).

[0067] La mutagénesis haploide y el cribado de compuestos de artemisinina identificaron la enzima, protoporfirinógeno oxidasa, PPOX, como el mayor éxito en ambas bibliotecas de mutantes. La PPOX es una enzima de la membrana mitocondrial interna que interviene en la producción celular de porfirina o hemo. Curiosamente, en el cribado se encontraron mutantes genéticos de todas y cada una de las enzimas de la ruta de biosíntesis de la porfirina, tanto en las mitocondrias (Alas1, Cpx, Ppx, Fech) como en el citoplasma (Alad, Hmbs, Uros, Urod), así como esencialmente todas las enzimas relevantes productoras de cofactores (Lias, Ogdh, Dlst, Lip1, Lipt2, Pdxk) así como las vías que alimentan la biosíntesis de protoporfirina o hemo [Figura 1B; Figura 5C]. El análisis de términos GO del perfil de detección de la artemisinina en las ESC confirmó que la biosíntesis de porfirinas era la vía más significativamente afectada en el contexto de la toxicidad de la artemisinina [Figura 1C]. Por lo tanto, el cribado genético en ESC haploides delinea la porfirinbiosíntesis como la vía definitiva y esencial para la citotoxicidad de la artemisinina.

[0068] Para confirmar los resultados del cribado de artemisinina de alto rendimiento a nivel individual, el solicitante probó clones de ESC mutantes individuales para determinar su susceptibilidad a la artemisinina. Se recuperaron colonias individuales de ambas bibliotecas de mutantes directamente de la criba y se utilizaron para establecer líneas celulares individuales. A partir de ellas, el solicitante generó clones de células hermanas marcadas como salvajes (mCherry_Cre) y *knockout* (GFP) (mediante la reversión del casete knock-out mediada por Cre-recombinasa) y controló sus tasas de crecimiento relativas en presencia de artemisinina. Mientras que las proporciones de células etiquetadas mixtas eran constantes en ausencia del compuesto o en las células control, la exposición a la artemisinina provocó una pérdida selectiva de células de tipo salvaje (mCherry_Cre) y una fuerte expansión de células *knockout* (GFP). El mapeo del sitio de inserción de las células resistentes (mediante secuenciación Sanger) confirmó la alteración de los componentes de la vía de biosíntesis de porfirinas [Figura 1D]. Estos resultados ratifican que las mutaciones de las enzimas de la vía de biosíntesis de la porfirina inducen resistencia a la artemisinina en las ESC de ratón.

[0069] A continuación, el solicitante evaluó si la modulación de la biosíntesis de porfirina celular es suficiente para alterar la susceptibilidad a la artemisinina. El solicitante utilizó el inhibidor farmacológico de la producción de porfirina o biosíntesis del hemo, el inhibidor de la protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) acifluorfenol, que bloquea la conversión de protoporfirinógeno IX en protoporfirina IX, y observó una mayor resistencia a la artemisinina en las ESC de ratón [Figura 2A] {Witkowski, D. A. & Halling, B. P. Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa vegetal por el herbicida acifluorfenol-metilo. *Plant Physiol.* 90, 1239-1242 (1989)}. Por el contrario, cuando el solicitante aumentó la producción de porfirina utilizando el aminoácido no proteinogénico y precursor endógeno análogo de la alanina ácido δ-aminolevulínico (5-ALA), aumentó la sensibilidad al compuesto antipalúdico [Figura 2B]. A continuación, el solicitante ensayó si diferentes líneas celulares de cáncer murino y humano responden de forma similar al tratamiento combinatorio, independientemente de los índices de crecimiento basal y susceptibilidad [Figura 5B].

[0070] El solicitante no sólo pudo confirmar que todas las células cancerosas probadas ganaron hipersensibilidad a la artemisinina [Figura 2C; Figura 6A]. Sin embargo, sorprendentemente también se observó que 5-ALA inducía hipersensibilidad a la citotoxicidad de la artemisinina en tres líneas celulares primarias de glioblastoma humano clínicamente relevantes derivadas de forma independiente [Figura 2D; Figura 6B, 6C].

[0071] Mecánicamente, se ha demostrado previamente que la artemisinina causa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) {Gopalakrishnan, A. M. & Kumar, N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 317-325 (2015)} {Stockwin, L. H. et al. La actividad anticancerígena de los dímeros de artemisinina se correlaciona con la generación de especies reactivas de oxígeno catalizada por hemo y la inducción de estrés del retículo endoplásmico. *Int. J. Cancer* 125, 1266-1275 (2009)} {Berman, P. A. & Adams, P. A. La artemisinina potencia la oxidación hemo-catalizada de las membranas lipídicas. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1283-1288 (1997).} La evaluación de los niveles de ROS (utilizando la sonda fluorescente sensible al redox Dihidroetidio, DHE) confirmó el aumento de los niveles de ROS tras el tratamiento con artemisinina [Figura 6D, 6E]. A continuación, evaluó si el 5-ALA tenía algún efecto sobre las ERO en presencia de artemisinina. En particular, el 5-ALA por sí solo desencadenó ROS y redujo ligeramente la viabilidad celular. Sin embargo, la combinación de 5-ALA con artemisinina produjo niveles muy elevados de ROS, así como un fuerte aumento de la muerte celular en dos contextos

celulares diferentes [Figura 2E, 2F; Figura 6F, 6G]. De forma similar, y asociada previamente con la inducción de ROS inducida por artemisinina, la polarización mitocondrial ($\Delta\Psi_m$, evaluada por la sonda de potencial de membrana mitocondrial JC-1) se elevó fuertemente en combinación con 5-ALA [Figura 6H] {Antoine, T. et al. La muerte rápida de los parásitos de la malaria por artemisinina y endoperóxidos semisintéticos implica la despolarización del potencial de membrana dependiente de ROS. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1005-1016 (2014)}. Cabe destacar que el tratamiento con 5-ALA solo también aumentó la polarización mitocondrial, lo que indica una sensibilización al tratamiento paralelo con artemisinina. Es importante destacar que todos los fenotipos mencionados (inducción de ROS, despolarización mitocondrial, muerte celular) pudieron suprimirse mediante la inhibición farmacológica de la producción de porfirina [Figura 2E, 2F; Figura 6F, 6G, 6H]. Estos resultados demostraron que los elevados niveles de ROS inducidos por la artemisinina y el 5-ALA (y la despolarización de la membrana mitocondrial) y la muerte celular pueden revertirse mediante la inhibición de la biosíntesis de porfirina.

[0072] La alteración del metabolismo celular y el aumento de la producción de porfirina se observan con frecuencia en células cancerosas humanas {Navone, N. M., Polo, C. F., Frisardi, A. L., Andrade, N. E. & Battle, A. M. Biosíntesis del hemo en el cáncer de mama humano—estudios 'in vitro' miméticos y algunos niveles de actividad enzimática del hemo. *Int. J. Biochem.* 22, 1407-1411 (1990)}. En los pacientes con glioblastoma humano, la elevada biosíntesis de porfirinas se utiliza terapéuticamente para localizar y dirigir el tejido canceroso, ya que los precursores de porfirinas (es decir, las protoporfirinas) muestran una fuerte fluorescencia que puede controlarse y explotarse funcionalmente {Zhao, S. et al. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies.}. Durante la resección de tejido tumoral en clínica, se utiliza la administración oral o intravenosa de 5-ALA para discriminar el tejido tumoral maligno de la materia cerebral sana, ya que las protoporfirinas fluorescentes, como la protoporfirina IX, se acumulan específicamente en las células tumorales {Marbacher, S. et al. Use of fluorescence to guide resection or biopsy of primary brain tumors and brain metastases. *Neurosurg Focus* 36, E10 (2014)}. Así pues, el solicitante evaluó si la biosíntesis de porfirinas alterada endógenamente en el cáncer cerebral puede aprovecharse terapéuticamente, utilizando una combinación de 5-ALA y artemisinina.

[0073] El solicitante utilizó un modelo de organoide de tumor cerebral humano recientemente establecido, que se basa en la manipulación genética de precursores neuronales en el curso del desarrollo del organoide cerebral, recapitulando así aspectos importantes de la formación de tumores humanos *in vitro* {Lancaster, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373-379 (2013)}. Las células tumorales se marcan simultáneamente con GFP, lo que permite el seguimiento espacial a lo largo del tiempo y la elaboración de perfiles de compuestos *in vitro* en organoides tumorales cerebrales humanos [Figura 3A]. El solicitante evaluó primero las tasas de crecimiento en presencia de artemisinina y 5-ALA en un modelo de neoplasia similar al tumor neuroectodérmico primitivo del sistema nervioso central (CNS-PNET), que se basa en la sobreexpresión del oncogén c-MYC {Bian, S. et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nat.*} [Figura 7A]. Los organoides de tumores cerebrales altamente malignos se trataron con diferentes dosis de 5-ALA, Artemisinina o una combinación de ambas [Figura 3B]. Dado que concentraciones muy elevadas de 5-ALA o artemisinina por sí solas provocaron una notable inhibición del crecimiento de los organoides tumorales positivos para GFP [Figura 7A], para todos los experimentos posteriores se eligieron concentraciones en las que los compuestos individuales no tuvieran efectos notables sobre el crecimiento tumoral u organoide. La combinación de 5-ALA y artemisinina redujo notablemente las células tumorales positivas para GFP en organoides cerebrales humanos [Figura 3C, 3D; Figura 7B]. La cuantificación del área de tejido tumoral en diferentes puntos temporales (d3, d5) [Figura 3E; Figura 7C] así como el análisis FACS (d5) [Figura 3F] confirmaron la reducción de las células GFP-positivas tras el tratamiento combinado con 5-ALA y artemisinina. La inmunohistoquímica de organoides cerebrales seccionados mostró además que el tratamiento con 5-ALA provocaba la pérdida de tejido tumoral GFP+, pero no tenía ningún efecto aparente sobre los tejidos neuronales no transformados en los organoides cerebrales, como las células que expresaban Sox2 y/o las estructuras en forma de roseta indicativas de células progenitoras [Figura 7D, 7]. En conjunto, estos datos sugieren que la terapia combinada de 5-ALA y artemisinina reduce fuertemente el número de células tumorales en un modelo de organoide de tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) humano *in vitro*.

[0074] Como el solicitante observó un marcado efecto de 5-ALA y artemisinina sobre los niveles de ROS, el solicitante realizó tinción con DHE y análisis de organoides tumorales con sobreexpresión de Myc. Mientras que las células tumorales positivas para GFP mostraban señales ROS basales ligeramente superiores en comparación con las células de tipo salvaje negativas para GFP (evaluadas mediante tinción con DHE y análisis FACS), los niveles de ROS aumentaron notablemente aún más con el tratamiento doble de 5-ALA y artemisinina, especialmente en las células cancerosas positivas para GFP [Figura 3G; Figura 9A]. Cabe destacar que el tratamiento con 5-ALA por sí solo también indujo ligeramente la producción de ROS en esta configuración, sensibilizando a la toxicidad de la artemisinina. Dado que las ERO intracelulares elevadas también provocan daños generalizados en las proteínas y el ADN, el solicitante evaluó la cantidad de roturas de doble cadena del ADN (DSB) en secciones de organoides tratados, y pudo observar efectivamente un aumento muy fuerte de células γ H2AX (histona H2AX fosforilada) positivas en el tejido tumoral GFP-positivo tratado doblemente con 5-ALA y artemisinina, pero no en las células de tipo salvaje [Figura 3H; Figura 9B, 9C]. Además, mientras que el número basal de células apoptóticas (positivas para Caspasa 3) y proliferantes (positivas para Ki67) aumentó en las células tumorales positivas para GFP en comparación con el tejido normal, la apoptosis aumentó aún más en las células tumorales positivas para GFP tras el tratamiento combinado con artemisinina y 5-ALA [Figura 10A-C].

[0075] Dado que el 5-ALA se utiliza clínicamente para el diagnóstico y la terapia de glioblastomas humanos, el solicitante evaluó el tratamiento combinado de 5-ALA y artemisinina en un modelo *in vitro* de organoide neoplásico similar al glioblastoma humano {Bian, S. et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. Nat.}. Estos organoides fueron diseñados para portar mutaciones de los genes supresores tumorales p53, NF1 y PTEN, junto con GFP, lo que nos permitió monitorizar el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo en presencia de Artemisinina, 5-ALA o una combinación de ambos. Mientras que tanto el 5-ALA como la Artemisinina por sí solos tuvieron escaso efecto sobre la supervivencia de las células no transformadas así como de las transformadas, la combinación de ambos compuestos ablació específicamente las células tumorales positivas para GFP en el modelo tumoral *in vitro* [Figura 4A; Figura 11A]. La cuantificación y el análisis de imagen de los organoides cerebrales confirmaron la pérdida progresiva de células tumorales y tejido GFP-positivos, pero no de los no transformados [Figura 4B;4C Figura 11B, 11C]. Estos datos demuestran que la 5-ALA y la artemisinina provocan un aumento de la muerte celular de las células tumorales en dos modelos de tumor cerebral altamente maligno, a través de niveles elevados de ROS y un mayor daño en el ADN.

[0076] En resumen, el solicitante delinea inequívocamente el requisito de la biosíntesis de porfirina como la vía endógena crítica para la citotoxicidad desencadenada por la artemisinina en células eucariotas. Mediante un sistema de cribado genético de alto rendimiento, el solicitante ha identificado que la función mitocondrial y, más concretamente, la biosíntesis de porfirina/heme, son necesarias para la actividad de este compuesto antipalúdico y anticancerígeno. La modulación genética y farmacológica de la producción de porfirina fue suficiente para modular la toxicidad de la artemisinina, así como para controlar los niveles de especies reactivas del oxígeno inducidas por la artemisinina, en múltiples contextos celulares y diferentes especies. En particular, la inducción de la biosíntesis del hemo por sí sola elevó ligeramente los niveles celulares de ROS, sensibilizando para la toxicidad inducida por la artemisinina. Además, el solicitante demuestra en varios sistemas *in vitro* independientes de modelos de organoides y esferoides de tumores cerebrales humanos, que el solicitante puede dirigirse específicamente a células de cáncer cerebral, en particular, glioblastomas humanos, utilizando el tratamiento combinado de 5-ALA y artemisinina para inducir la muerte celular.

[0077] Tras demostrar una fuerte sinergia de la artemisinina (ART) y el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) para el tratamiento del cáncer cerebral, el solicitante evaluó a continuación si esta sinergia se extiende a otros derivados de ART, tipos de cáncer adicionales, y si esta doble combinación es sinérgica con los regímenes de tratamiento del cáncer aplicados actualmente, en particular la quimioterapia. Mediante un ensayo de viabilidad de 6 días, el solicitante confirmó que el propio ART y los derivados del ART más comúnmente utilizados, la dihidroartemisinina (DHA) y el artesunato (ARS), en combinación con 5-ALA, muestran efectos antiproliferativos fuertemente sinérgicos en múltiples líneas celulares de glioblastoma, así como en las células madre embrionarias de ratón (ESC, Figura 12) altamente proliferativas. A partir de estos datos, el solicitante obtuvo combinaciones de dosis específicas para cada tipo de célula y compuesto para los siguientes análisis.

[0078] El glioblastoma multiforme es un cáncer muy agresivo que actualmente se trata mediante resección quirúrgica máxima, seguida de radioterapia más tratamiento concomitante y de mantenimiento con temozolomida (TMZ). Los inventores han demostrado que la combinación de TMZ con 5-ALA más ART o DHA es más eficaz que todas las combinaciones dobles posibles en todas las líneas de glioblastoma ensayadas (Figura 13). En las ESC, por ejemplo, sólo la combinación doble de DHA y 5-ALA provoca un efecto citotóxico de la TMZ, lo que indica una clara sinergia.

[0079] Estos hallazgos se extienden a ARS y la combinación de ARS con 5-ALA y TMZ es más eficaz que la sustitución de 5-ALA por su derivado Metil-5-ALA (M-5-Ala) en 4 de 5 líneas de glioblastoma probadas (Figura 14).

[0080] La lomustina (CCNU) es una alternativa a la TMZ en el tratamiento de los cánceres cerebrales y, al igual que en el caso de la TMZ, sus efectos citostáticos pueden reforzarse especialmente mediante la combinación con ART más 5-ALA en comparación con todas las combinaciones dobles posibles (Figura 15).

[0081] Además, los inventores probaron la combinación de ART y derivados con 5-ALA en líneas celulares cancerosas procedentes de otros tejidos. Los inventores no sólo descubrieron una fuerte sinergia de ART/DHA/ARS con 5-ALA en la reducción de la supervivencia de estas líneas de cáncer, sino que además esta doble combinación mejora los agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizados cisplatino (CP), carboplatino, triptolida, homoharringtonina, dactinomicina, doxorubicina, epirrubicina, vinorebina, temozolomida, lomustina y 5-fluorouracilo (5-FU). Esto se comprobó especialmente en dos líneas celulares de cáncer de pulmón (Figura 16), células HepG2 (hígado, Figura 17), células MD-MBA-231 (mama, Figura 18) y células MiaPaca-2 (páncreas, Figura 19). En conjunto, los datos del inventor muestran por primera vez el gran potencial del tratamiento con ART y derivados de ART en combinación con 5-ALA y agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente y especialmente un fármaco antiglioblastoma en, por ejemplo, cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de páncreas.

[0082] Así, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo formado por artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, para su uso en profilaxis y/o

tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón y especialmente glioblastoma.

[0083] Preferentemente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo formado por artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, para su uso en profilaxis y/o tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón y especialmente glioblastoma.

[0084] Aún más preferentemente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo formado por artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo que consiste en temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo y el más preferido es la temozolomida para su uso en profilaxis y/o tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón y especialmente glioblastoma.

[0085] Para uso en profilaxis y/o tratamiento de un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente, cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, una proporción molar del compuesto de artemisinina y el ácido 5-aminolevulínico está en un intervalo de 1:5 a 1:5000, preferiblemente 1:5 a 1:1000, más preferiblemente 1:5 a 1:500, aún más preferiblemente 1:10 a 1:250, más preferiblemente 1:10 a 1:100 en la composición farmacéutica.

[0086] Para uso en profilaxis y/o tratamiento de un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente, cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, una proporción molar del compuesto de artemisinina y el ácido metil-5-aminolevulínico se encuentra en un intervalo de 1:5 a 1:5000, preferiblemente 1:5 a 1:1000, más preferiblemente 1:5 a 1:500, aún más preferiblemente 1:10 a 1:250, más preferiblemente 1:10 a 1:100 en la composición farmacéutica.

[0087] La composición farmacéutica según la invención comprende un compuesto de artemisinina o una sal farmacéuticamente aceptable, cocrystal, solvato del mismo y ácido 5-aminolevulínico o ácido metil-5-aminolevulínico y preferentemente ácido 5-aminolevulínico y el agente quimioterapéutico, preferentemente el fármaco antiglioblastoma como únicos principios activos especialmente para el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferentemente cáncer cerebral y más preferentemente glioblastoma.

[0088] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la profilaxis y/o el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón, y especialmente glioblastoma que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo formado por artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

[0089] Además, la presente invención se refiere a un método para la profilaxis y/o el tratamiento de un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de pulmón, y especialmente glioblastoma que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina(**1**) seleccionado del grupo formado por artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un agente quimioterapéutico, según se define en las reivindicaciones.

[0090] Aún más preferentemente, la presente invención se refiere a un método para la profilaxis y/o tratamiento de un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de

mama y cáncer de pulmón, y especialmente glioblastoma que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende

- a) un compuesto de artemisinina(1) seleccionado del grupo formado por artemisinina (1a), dihidroartemisinina (1b) y artesunato (1e), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- b) ácido 5-aminolevulínico (2) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo, siendo el más preferido la temozolomida.

[0091] Opcionalmente, para su uso en profilaxis y/o tratamiento de un cáncer seleccionado entre cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente, cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, la composición farmacéutica según la presente invención comprende además portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse en un portador o diluyente sólido o líquido convencional y un adyuvante farmacéutico convencional a un nivel de dosificación adecuado de forma conocida.

[0092] Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se administrarán típicamente junto con un portador aceptable adecuado seleccionado con respecto a la forma de administración prevista, es decir, para administración oral en forma de comprimidos, cápsulas (re llenas sólidas, re llenas semisólidas o re llenas líquidas), polvos para constitución, geles, elixires, gránulos dispersables, jarabes, suspensiones y similares, y de forma coherente con las prácticas farmacéuticas convencionales. Por ejemplo, para la administración oral en forma de comprimidos o cápsulas, el componente activo del fármaco puede combinarse con cualquier portador oral no tóxico farmacéuticamente aceptable, preferiblemente con un portador inerte como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico (cápsulas re llenas de líquido) y similares. Además, también pueden incorporarse al comprimido o cápsula aglutinantes, lubricantes, agentes desintegradores y colorantes adecuados. Los polvos y comprimidos pueden contener entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 95 % en peso de los derivados según la fórmula general (I) o compuestos análogos de los mismos o la respectiva sal farmacéuticamente activa como principio activo.

[0093] Entre los aglutinantes adecuados se encuentran el almidón, la gelatina, los azúcares naturales, los edulcorantes de maíz, las gomas naturales y sintéticas como la acacia, el alginato de sodio, la carboximetilcelulosa, el polietilenglicol y las ceras. Entre los lubricantes adecuados pueden mencionarse el ácido bórico, el benzoato sódico, el acetato sódico, el cloruro sódico y similares. Entre los desintegrantes adecuados se encuentran el almidón, la metilcelulosa, la goma guar y similares. También pueden incluirse, en su caso, edulcorantes y aromatizantes, así como conservantes. Los desintegrantes, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, etc. se tratan con más detalle a continuación.

[0094] Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en forma de liberación sostenida para proporcionar la tasa de liberación controlada de uno o más de los componentes o ingredientes activos para optimizar el(los) efecto(s) terapéutico(s), por ejemplo, la actividad anticancerígena o la actividad contra las metástasis del cáncer y similares. Las formas de dosificación adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos con capas de diferentes velocidades de desintegración o liberación controlada, matrices poliméricas impregnadas con los componentes activos y conformadas en forma de comprimido o cápsulas que contienen dichas matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

[0095] Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Como ejemplo, pueden mencionarse las soluciones de agua o agua/propilenglicol para inyecciones parenterales o la adición de edulcorantes y opacificantes para soluciones orales, suspensiones y emulsiones. Los preparados en forma líquida también pueden incluir soluciones para administración intranasal.

[0096] Las preparaciones en aerosol adecuadas para la inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar presentes en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, como un gas inerte comprimido, por ejemplo, nitrógeno.

[0097] Para preparar supositorios, se funde primero una cera de baja fusión, como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos como la manteca de cacao, y a continuación se dispersa homogéneamente en ella el principio activo, por ejemplo, agitando. A continuación, la mezcla fundida y homogénea se vierte en moldes de tamaño adecuado, se deja enfriar y se solidifica.

[0098] También se incluyen las preparaciones en forma sólida, que están destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral o parenteral. Estas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

[0099] El término cápsula, tal como se recita en el presente documento, se refiere a un recipiente o envoltorio específico hecho, por ejemplo, de metilcelulosa, alcoholes polivinílicos o gelatinas desnaturalizadas o almidón para contener composiciones que comprenden el (los) principio(s) activo(s). Las cápsulas de cáscara dura suelen estar hechas de una

mezcla de gelatinas de resistencia relativamente alta procedentes de huesos o piel de cerdo. La propia cápsula puede contener pequeñas cantidades de colorantes, opacificantes, plastificantes y/o conservantes.

5 **[0100]** Por comprimido se entiende una forma de dosificación sólida comprimida o moldeada que comprende los principios activos con diluyentes adecuados. El comprimido puede prepararse por compresión de mezclas o granulaciones obtenidas por granulación húmeda, granulación seca o por compactación bien conocida por una persona con conocimientos ordinarios en la materia.

10 **[0101]** Los geles orales hacen referencia a los principios activos dispersos o solubilizados en una matriz semisólida hidrófila.

[0102] Los polvos para constitución se refieren a mezclas en polvo que contienen los principios activos y diluyentes adecuados que pueden suspenderse, por ejemplo, en agua o en zumo.

15 **[0103]** Los diluyentes adecuados son sustancias que suelen constituir la mayor parte de la composición o forma de dosificación. Los diluyentes adecuados incluyen azúcares como la lactosa, la sacarosa, el manitol y el sorbitol, almidones derivados del trigo, el maíz, el arroz y la patata, y celulosas como la celulosa microcristalina. La cantidad de diluyente en la composición puede oscilar entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 95 % en peso de la composición total, preferiblemente entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 75 % en peso, y más preferiblemente entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 60 % en peso.

25 **[0104]** El término desintegrantes se refiere a los materiales añadidos a la composición para ayudar a romper (desintegrar) y liberar los ingredientes farmacéuticamente activos de un medicamento. Los desintegrantes adecuados incluyen almidones, almidones modificados como el carboximetilalmidón sódico, gomas naturales y sintéticas como la garrofín, la karaya, el guar, el tragacanto y el agar, derivados de la celulosa como la metilcelulosa y la carboximetilcelulosa sódica, celulosas microcristalinas y celulosas microcristalinas reticuladas como la croscaramelosa sódica, alginatos como el ácido alginico y el alginato sódico, arcillas como las bentonitas y mezclas efervescentes. La cantidad de desintegrante en la composición puede oscilar entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 20 % en peso de la composición, más preferiblemente entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 10 % en peso.

30 **[0105]** Los aglutinantes son sustancias que unen o "pegan" las partículas de polvo y las hacen cohesivas formando gránulos, sirviendo así de "adhesivo" en la formulación. Los aglutinantes añaden fuerza cohesiva ya disponible en el diluyente o agente de carga. Entre los aglutinantes adecuados figuran azúcares como la sacarosa, almidones derivados del trigo, el maíz, el arroz y la patata, gomas naturales como la acacia, la gelatina y el tragacanto, derivados de algas marinas como el ácido alginico, el alginato sódico y el alginato cálcico de amonio, materiales celulósicos como la metilcelulosa, la carboximetilcelulosa sódica y la hidroxipropilmetilcelulosa, la polivinilpirrolidona y compuestos inorgánicos como el silicato de magnesio y aluminio. La cantidad de aglutinante en la composición puede oscilar entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 20 % en peso de la composición, preferiblemente entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 10 % en peso, y más preferiblemente entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 6 % en peso.

45 **[0106]** Los lubricantes se refieren a una clase de sustancias que se añaden a la forma de dosificación para permitir que los gránulos de comprimidos, etc., después de ser comprimidos, se liberen del molde reduciendo la fricción o el desgaste. Los lubricantes adecuados incluyen estearatos metálicos como el estearato de magnesio, el estearato de calcio o el estearato de potasio, ácido esteárico, ceras de alto punto de fusión y otros lubricantes solubles en agua como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicoles y D,L-leucina. Los lubricantes suelen añadirse en el último paso antes de la compresión, ya que deben estar presentes en la superficie de los gránulos. La cantidad de lubricante en la composición puede oscilar entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5 % en peso de la composición, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 % en peso, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,5 % en peso de la composición.

50 **[0107]** Los antiapelmazantes son materiales que evitan el apelmazamiento de los componentes de la composición farmacéutica y mejoran las características de fluidez del granulado para que el flujo sea suave y uniforme. Entre los antiapelmazantes adecuados se encuentran el dióxido de silicio y el talco. La cantidad de antiapelmazante en la composición puede oscilar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 % en peso de la composición final, preferentemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 % en peso.

60 **[0108]** Los colorantes son excipientes que proporcionan coloración a la composición o a la forma farmacéutica. Tales excipientes pueden incluir colorantes de calidad alimentaria adsorbidos en un adsorbente adecuado, como arcilla u óxido de aluminio. La cantidad del agente colorante puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 % en peso de la composición, preferentemente de aproximadamente 0,1 a 1 % en peso.

[0109] Así, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o consiste en

65 a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo que consiste en artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;

- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5

[0110] Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10

15

[0111] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20

25

[0112] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma;
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30

35

[0113] Además, la presente solicitud se refiere preferentemente a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) un compuesto de artemisinina(**1**) seleccionado del grupo formado por artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40

45

[0114] Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50

[0115] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

55

60

[0116] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma; y
b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
c) al menos un agente quimioterapéutico, como se menciona en las reivindicaciones, y
d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

65

[0117] Además, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 5 a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo que consiste en artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 **[0118]** Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 15 a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 **[0119]** Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 25 a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 **[0120]** Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 35 a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**), ácido metil-5-aminolevulínico (**2b**), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 **[0121]** Además, la presente solicitud se refiere preferentemente a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 45 a) un compuesto de artemisinina (**1**) seleccionado del grupo que consiste en artemisinina (**1a**), dihidroartemisinina (**1b**) y artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 **[0122]** Más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 55 a) artemisinina (**1a**) o artesunato (**1e**), o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

60 **[0123]** Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- 65 a) artesunato (**1e**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un fármaco anti glioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0124] Aún más preferentemente, la presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en

- a) artemisinina (**1a**) o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma;
- b) ácido 5-aminolevulínico (**2**) o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo; y
- c) al menos un fármaco antiglioblastoma seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo; el más preferido es la temozolomida; y
- d) un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0125] La composición farmacéutica según la presente invención puede administrarse en combinación con una radioterapia, inmunoterapia, terapia de campo electromagnético, terapia de hipertermia, quimioterapia, inmunoterapia del cáncer y/o una terapia basada en moléculas pequeñas.

[0126] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica según la presente invención se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma preferiblemente en combinación con un solo agente quimioterapéutico, preferiblemente un solo fármaco antiglioblastoma, en el que el agente quimioterapéutico, preferiblemente el fármaco antiglioblastoma se selecciona de temozolomida.

[0127] Tal como se utiliza aquí, "combinación" o "combinación farmacéutica" significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un principio activo e incluye combinaciones fijas y no fijas de los principios activos.

[0128] El término "combinación fija" o "dosis fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de fórmula 1 y un compañero de combinación, es decir, un agente anticanceroso, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosis. En otros términos: los principios activos están presentes en una forma de dosificación, por ejemplo, en un comprimido o en una cápsula.

[0129] El término "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de fórmula 1 y un compañero de combinación, es decir, un agente anticanceroso, se administran ambos a un paciente como entidades separadas, ya sea simultánea, concurrente o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en el que dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo de un mamífero o humano que lo necesite. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más agentes anticancerígenos.

[0130] Dicha combinación farmacéutica puede administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los socios de la combinación muestren un efecto sinérgico.

[0131] Por "efecto sinérgico" se entiende un efecto terapéutico observado tras la administración de dos o más principios activos (por ejemplo, un compuesto de artemisinina, 5-ALA, al menos un agente quimioterapéutico o, preferentemente, el al menos un fármaco antiglioblastoma) que es mayor que el efecto obtenido mediante la administración de cada principio activo por separado. Así pues, se produce un efecto sinérgico cuando el efecto obtenido es mayor que el efecto adicional esperado por la coadministración de los principios activos.

[0132] Por "aumento sinérgico" se entiende la combinación de dos o más ingredientes activos (por ejemplo, un compuesto de artemisinina, 5-ALA, al menos un fármaco antiglioblastoma) que resulta en un aumento de la muerte de células cancerosas que excede sólo un efecto adicional esperado por la coadministración de los ingredientes activos.

[0133] Por "disminución sinérgica" se entiende la combinación de dos o más principios activos (por ejemplo, un compuesto de artemisinina, 5-ALA, al menos un fármaco contra el glioblastoma) que produce una disminución de uno o más síntomas de un cáncer que es mayor que el simple efecto adicional esperado por la coadministración de los principios activos.

[0134] En otro ejemplo de sinergia, se observa un efecto terapéutico para la combinación de dos o más ingredientes activos, donde uno o más de los ingredientes activos están presentes a una dosis que normalmente no es terapéutica. En otro ejemplo de sinergia, la combinación de dos o más principios activos produce una disminución inesperada de la toxicidad (es decir, un nivel de toxicidad inferior a la suma de la toxicidad observada tras la administración de los agentes por separado).

[0135] Sin embargo, también puede obtenerse un efecto sinérgico combinando la administración de la composición farmacéutica según la presente invención con un tratamiento mediante radioterapia, inmunoterapia, terapia de campo electromagnético, terapia de hipertermia, quimioterapia, inmunoterapia del cáncer o, como se ha expuesto anteriormente, cualquier otra terapia basada en moléculas pequeñas.

[0136] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se utiliza en forma de comprimido, cápsula, jarabe, solución,

suspensión, emulsión o gel.

[0137] En algunas realizaciones, para la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, preferiblemente cáncer cerebral, más preferiblemente, glioblastoma, la composición farmacéutica se administra por vía oral o parenteral.

[0138] Las preparaciones preferidas están adaptadas para la aplicación oral. Estas formas de administración incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, comprimidos peliculares, comprimidos recubiertos, cápsulas, polvos y depósitos.

[0139] La aplicación parenteral incluye la aplicación dérmica, intradérmica, intragastral, intracutánea, intravascular, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrabucal, percutánea, rectal, subcutánea, sublingual, tópica o transdérmica. Preferiblemente, la aplicación parenteral incluye la aplicación intradérmica, intragastral, intracutánea, intravascular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, tópica, transdérmica y la inhalación.

[0140] Las composiciones transdérmicas pueden tener la forma de una crema, una loción, un aerosol y/o una emulsión y pueden incluirse en un parche transdérmico del tipo matriz o reservorio como se conoce en la técnica para este fin.

[0141] El término cápsula, tal como se recita en el presente documento, se refiere a un recipiente o envoltorio específico hecho, por ejemplo, de metilcelulosa, alcoholes polivinílicos o gelatinas desnaturalizadas o almidón para contener composiciones que comprenden el (los) principio(s) activo(s). Las cápsulas de cáscara dura suelen estar hechas de una mezcla de gelatinas con una fuerza de gel relativamente alta procedentes de huesos o piel de cerdo. La propia cápsula puede contener pequeñas cantidades de colorantes, opacificantes, plastificantes y/o conservantes. Por comprimido se entiende una forma de dosificación sólida comprimida o moldeada que comprende los principios activos con diluyentes adecuados. El comprimido puede prepararse por compresión de mezclas o granulaciones obtenidas por granulación húmeda, granulación seca o por compactación bien conocida por una persona con conocimientos ordinarios en la materia.

[0142] Los geles orales se refieren a los ingredientes activos dispersos o solubilizados en una matriz hidrofílica semisólida. Los polvos para constitución se refieren a mezclas en polvo que contienen los principios activos y diluyentes adecuados que pueden suspenderse, por ejemplo, en agua o en zumo.

[0143] Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en forma de liberación sostenida para proporcionar la tasa de liberación controlada de uno o más de los componentes o ingredientes activos para optimizar el/los efecto(s) terapéutico(s), por ejemplo, la actividad anticancerígena y similares. Las formas de dosificación adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos con capas de diferentes velocidades de desintegración o matrices poliméricas de liberación controlada impregnadas con los componentes activos y conformadas en forma de comprimido o cápsulas que contienen dichas matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

[0144] En algunas realizaciones, para la profilaxis y/o el tratamiento del glioblastoma, el compuesto de artemisinina, en particular artemisinina(1a), contenido en la composición farmacéutica se administra en un intervalo de 0,01 a 100 mg/kg, preferido, 0,1 a 100 mg/kg, más preferido 0,1 a 15 mg/kg por peso corporal y día, y el ácido 5-aminolevulínico se administra en un intervalo de 0,01 a 200 mg/kg, preferido, 0,1 a 200 mg/kg.1 a 50 mg/kg, más preferido 0,1 a 15 mg/kg por peso corporal y día, y el ácido 5-aminolevulínico se administra en un intervalo de 0,01 a 200 mg/kg, preferido, 0,1 a 200 mg/kg, más preferido 0,1 a 50 mg/kg, más preferido 1 a 50 mg/kg por peso corporal y día.

[0145] Preferentemente, la dosis de la invención relativa al compuesto de artemisinina, en particular artemisinina se administra al menos 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 3,50, 4,00, 4,50, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5 o 15,0 mg/kg de artemisinina por peso corporal y día.

[0146] Preferentemente, la dosis de la invención relativa al ácido 5-aminolevulínico se administra al menos 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 3,50, 4,00, 4,50, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 17,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0, 45,0 o 50,0 mg/kg de ácido 5-aminolevulínico por peso corporal y día.

[0147] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento del glioblastoma preferentemente en combinación con el al menos un agente quimioterapéutico, preferentemente el al menos un fármaco antiglioblastoma, en el que el al menos un fármaco antiglioblastoma se administra en un intervalo de 0,01 a 100 mg/kg por peso corporal y día.

[0148] Preferentemente, la dosis de la invención relativa al agente quimioterapéutico, preferentemente el fármaco antiglioblastoma se administra al menos 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 3,50, 4,00, 4,50, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5 o 15,0 mg/kg de agente

quimioterapéutico o fármaco antiglioblastoma, respectivamente, por peso corporal y día.

5 **[0149]** Ejemplos de tales composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, soluciones listas para inyección, productos secos listos para ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección y emulsiones.

10 **[0150]** Algunos vehículos adecuados que pueden utilizarse para proporcionar composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a: Agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, cloruro sódico inyectable, Ringer inyectable, dextrosa inyectable, dextrosa y cloruro sódico inyectable, y Ringer lactato inyectable; vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitados a, alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

15 **[0151]** Las dosis adecuadas de los ingredientes activos pueden ser determinadas por un médico experto. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. Así, la dosis es típicamente una dosis efectiva o terapéuticamente efectiva.

20 **[0152]** El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

25 **[0153]** Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse una dosis única (por ejemplo, una dosis única diaria), pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La forma unitaria de dosificación, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

30 **[0154]** En las composiciones y productos según la invención, los ingredientes activos pueden estar presentes cada uno, por ejemplo, en una concentración de entre 0,001 y 20% en peso, en relación con el peso total de la composición o producto, preferiblemente entre 0,01 y 10%, más preferiblemente entre 0,02 y 5% en peso, y más preferiblemente aún entre 1 y 4% en peso. En una realización particular, cada uno de los tres ingredientes activos está presente en una concentración de entre el 1 y el 3% en peso.

35 **[0155]** En un aspecto actualmente preferido, el compuesto de artemisinina, en particular la artemisinina, se formula para su administración de 50 a 500 mg (más preferentemente de 100 a 300 mg, como unos 200 mg) al día (sobre la base de un peso corporal de aproximadamente 70 kg; las dosis pueden ajustarse proporcionalmente según el peso corporal). Preferiblemente, la artemisinina está formulada para administración oral o parenteral.

40 **[0156]** Preferiblemente, el compuesto de artemisinina, en particular la artemisinina, se administra durante un período de 3 a 30 días, más preferiblemente de 10 a 20 días, como por ejemplo unos 14 días. Este periodo puede corresponder a un ciclo de tratamiento en un régimen de administración que comprenda múltiples ciclos de tratamiento (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más ciclos, por ejemplo, continuando dichos ciclos hasta que se hayan alcanzado los resultados terapéuticos deseados). Cada ciclo de tratamiento puede estar separado por una interrupción del compuesto de artemisinina, en particular de la administración de artemisinina; dicha interrupción puede permitir, por ejemplo, la recuperación de la médula ósea. La interrupción de la administración puede consistir en no administrar el compuesto de artemisinina, en particular la artemisinina, durante un período de 3 a 14 días, más preferiblemente de 5 a 10 días, por ejemplo unos 7 días.

45 **[0157]** En un aspecto ejemplar de este tipo, el compuesto de artemisinina, en particular la artemisinina, se administra a unos 200 mg diarios durante un ciclo de tratamiento de dos semanas, y cada ciclo va seguido de un descanso de una semana.

50 **[0158]** En algunas realizaciones, dicha composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento del glioblastoma, preferentemente en combinación con radioterapia, inmunoterapia, terapia de campo electromagnético y/o terapia de hipertermia.

55 **[0159]** En una realización preferida, dicha composición farmacéutica se utiliza para la profilaxis y/o el tratamiento del glioblastoma en el que el glioblastoma se selecciona entre los subtipos proneural (PN), mesenquimal (MES) y glioblastoma clásico (CL).

Descripción de las Figuras

[0160]

5 **Figura 1: Cribado haploide en células madre de ratón delinea la biosíntesis de porfirina como requisito previo para la toxicidad de la artemisinina en células de mamífero.** **A** Esquema de los cribados de células madre embrionarias haploides para la identificación de dianas compuestas. **B** Vía de biogénesis de la porfirina. Se indica la localización subcelular (citosol, mitocondrias) y las puntuaciones de pérdida de función (cursiva) de las principales enzimas (negrita, mayúsculas) y cofactores (normal, mayúsculas) del cribado (mutagénesis retroviral). **C** El análisis de términos GO revela que la biogénesis de porfirinas es la principal vía a la que se dirige la artemisinina. **D** Ensayo de crecimiento competitivo de clones unicelulares resistentes a la artemisinina. Se obtuvieron clones hermanos de tipo salvaje (mCherry+ Cre) y *knockout* (GFP+) a partir de colonias resistentes mutantes (retrovirus - intrón RE, sombreado más oscuro, transposón Tol2 - intrón T2, sombreado más claro), tratadas con artemisinina, analizadas con citometría de flujo y secuenciadas con Sanger para el mapeo del sitio de inserción.

15 **Figura 2: La modulación de la biosíntesis de porfirinas es suficiente para alterar la toxicidad de la artemisinina en las células a través de la generación de ROS.** **A, B** Supervivencia celular de células madre embrionarias de ratón tratadas con Artemisinina en combinación con **A** el inhibidor de la Ppox acifluorfenol o **B** 5-ALA (0,5mM). Se utilizó la tinción con azul Alamar para evaluar la viabilidad tras 48 h de tratamiento. **C** Viabilidad celular de células de cáncer de mama de ratón (4T1) tratadas con artemisinina en presencia y ausencia de 5-ALA (0,5mM). Se utilizó azul Alamar para determinar la supervivencia celular tras 48 h de tratamiento. **D** Supervivencia de células primarias de glioblastoma humano tratadas con artemisinina procedentes de pacientes con cáncer tras la administración de 5-ALA. La viabilidad se evaluó mediante CellTiter-Glo después de 72 h. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores son la media \pm SD. **E** Niveles de ROS (tinción DHE, PE 582/15 nm - MFI) y **F** supervivencia celular de células de neuroblastoma (SHSY5Y) tratadas con artemisinina (0,5 μ M), 5-ALA (0,25mM) o inhibidor de Ppox (10 μ M). La fluorescencia de DHE (niveles de ROS) y el número de células (supervivencia) se evaluaron mediante citometría de flujo y recuento celular automatizado. Los experimentos se realizaron dos veces, por triplicado cada uno. Los valores indican la media \pm SD.

20 **Figura 3: Los organoides tumorales cerebrales (CNS-PNET) muestran una mayor sensibilidad al tratamiento combinado con artemisinina y 5-ALA.** **A** Organoides de tumor neuroectodérmico primitivo cerebral humano para la elaboración de perfiles de compuestos. **B** Representación esquemática del flujo de trabajo y análisis de organoides tratados con 5-ALA y artemisinina. **C** Imágenes representativas de fluorescencia y **D** de campo claro de organoides tumorales tratados con DMSO (control), 5-ALA (0,0625mM), artemisinina (1 μ M), o 5-ALA y artemisinina (0,0625mM y 1 μ M) (CNS-PNET). Se tomaron imágenes de los organoides los días 1, 5 y 7. Barra de escala 500 μ m. **E** Análisis de imagen y cuantificación del área tumoral GFP-positiva de los organoides tratados. Se analizaron ocho organoides por grupo el día 3 y se normalizaron con respecto al día 1. Los datos se muestran como diagramas de caja (percentiles 25-75, mediana). **F** Análisis por citometría de flujo de organoides tumorales cerebrales disociados. Se muestran los porcentajes relativos de células tumorales GFP+ de al menos ocho organoides por condición en el día 5 normalizados con respecto al control (DMSO). Se indican los gráficos de caja (percentiles 25-75, mediana) de los datos. **G** Tinción ROS/ DHE y análisis por citometría de flujo de organoides tumorales disociados (PE, 582/15 nm). Se indican las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de las células tumorales GFP+ teñidas con DHE y las células de control GFP-. n=2, los valores son la media \pm SD. **H** Cuantificación de células γ H2AX+ en organoides tumorales cerebrales. Se tiñeron 6 criosecciones de 3 organoides cada una para γ H2AX, se escanearon y se analizaron 25 regiones de interés (ROI 2,500 μ m²) por condición. Las cifras brutas se normalizaron con respecto al área organoide (por ROI) y se muestran como gráficos de caja (percentiles 25-75, mediana).

25 **Figura 4: Modelos de organoides neoplásicos similares al glioblastoma humano muestran una mayor sensibilidad a la terapia combinada de artemisinina y 5-ALA.** **A** Imágenes representativas de fluorescencia (panel izquierdo) y campo claro (panel derecho) de organoides tumorales cerebrales humanos tratados con 5-ALA y artemisinina. Se controlaron los organoides el día 1, el día 5, el día 8 y el día 11. Barra de escala 500 μ m. **B** Análisis de imagen y cuantificación de los organoides tratados. El área de células tumorales GFP-positivas en d11 se normalizó con respecto a d1. Los datos se muestran como diagramas de caja (percentiles 25-75, mediana) n=4. **C** Imágenes de campo claro representativas de esferoides de glioblastoma derivados de pacientes tratados con 5-ALA y artemisinina (VBT92). Las imágenes se tomaron el día 3 de cultivo y tratamiento.

30 **Figura 5 (relacionada con la Figura 1): Curvas de valoración de la artemisinina y visión general de la vía de biosíntesis de la porfirina.** **A, B** Supervivencia celular de **A** ESC de ratón y **B** fibroblastos primarios (MEF p3) tratados con artemisinina, así como de células cancerosas de ratón (B16F10, 4T1) y humanas (MDA-MB-231, MCF7, Panel). La viabilidad se evaluó tras 48 h de tratamiento mediante tinción con azul Alamar. **C** Sitios de integración de componentes de la vía de biosíntesis de la porfirina de pruebas de artemisinina. Se muestran las localizaciones genómicas y los intrones y exones diana de los genes de la biosíntesis de la porfirina (es decir, las enzimas, en negrita), así como los sitios de integración retroviral (panel superior) o del transposón Tol2 (panel inferior) (barras verticales) en la cadena directa (negro) y en la inversa (gris).

35 **Figura 6 (relacionada con la Figura 2): Efectos del tratamiento combinado de artemisinina y 5-ALA sobre la**

supervivencia, la producción de ROS y el potencial de membrana mitocondrial en líneas celulares cancerosas

A Supervivencia celular de células cancerosas de ratón tratadas con artemisinina (Mcf7 - cáncer de mama; B16F10 - melanoma) en presencia y ausencia de 5-ALA (0,5mM). Se utilizó azul Alamar para determinar la viabilidad después de 48 h. **B, C** Supervivencia celular de células primarias de glioblastoma humano tratadas con artemisinina en presencia o ausencia de 5-ALA. Se utilizó CellTiter-Glo para evaluar la viabilidad, 72h. Los valores son la media \pm SD. **D, E** Tinción ROS/ DHE y análisis por citometría de flujo de células **D Jurkat** y **E HL-60** tratadas con piperlongumina o artemisinina (48 h). Los valores son la media \pm SD. **F** Niveles de ROS (tinción DHE, PE 582/15 nm - MFI), **G** supervivencia celular y **H** niveles de JC-1 de células Jurkat tratadas con artemisinina (0,5 μ M), 5-ALA (0,25mM) o inhibidor de Ppox (10 μ M), 48h. Las células JC-1 negativas presentan un potencial de membrana mitocondrial alterado asociado a la muerte celular apoptótica. La fluorescencia DHE, el número relativo de células y el porcentaje de células JC-1 negativas se evaluaron mediante citometría de flujo de alto rendimiento y recuento celular automatizado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron una (JC-1) o dos veces (DHE, supervivencia celular). Los valores son la media \pm SD.

Figura 7 (relacionada con la figura 3): La población de células cancerosas en organoides tumorales CNS-PNET muestra una alta sensibilidad a la terapia combinada de artemisinina y 5-ALA. **A** Supervivencia celular de organoides tumorales CNS-PNET disociados. Se muestra la cuantificación de las células tumorales GFP+ y las células control GFP- de los organoides tratados normalizada con el control (DMSO). Los datos se muestran como diagramas de caja (percentiles 25-75, mediana). **B** Imágenes representativas de fluorescencia (panel izquierdo) y campo claro (panel derecho) de organoides tumorales cerebrales tratados con control (DMSO), 5-ALA (0,0625mM), artemisinina (1 μ M) o 5-ALA + artemisinina (0,0625mM y 1 μ M). Barra de escala 500 μ m. **C** Cuantificación por imagen del área tumoral GFP-positiva en el día 5 de tratamiento, en comparación con el día 1. Se muestran gráficos de caja (percentiles 25-75, mediana) de los datos. **D** Imágenes representativas de secciones teñidas con anti-Sox2, anti-GFP y DAPI de organoides tratados con artemisinina y 5-ALA. Barra de escala 50 μ m.

Figura 8 (relacionada con la figura 3): Tinción de secciones de organoides tumorales CNS-PNET tras el tratamiento con artemisinina y 5-ALA. Imágenes representativas de fluorescencia (anti-GFP, DAPI) y H&E (hematoxilina y eosina) de criosecciones fijadas de organoides tumorales de control y tratados. Se indican y amplían (6,8x) las regiones de estructuras en roseta (R) o tejido tumoral (T). Barra de escala 500 μ m.

Figura 9 (relacionada con la figura 3): Análisis de organoides tumorales CNS-PNET tras el tratamiento con artemisinina y 5-ALA **A** Gráficos FACS representativos de organoides tumorales disociados teñidos con ROS/ DHE. Se muestran los análisis de citometría de flujo (PE, 582/15 nm) de células tumorales GFP+ y células de tipo salvaje GFP-. **B** Imágenes de microscopía representativas de secciones de organoides tumorales teñidas con γ H2AX, GFP y DAPI. Barra de escala 50 μ m. **C** Imágenes representativas y máscaras de análisis de portaobjetos de organoides tumorales teñidos con γ H2AX y escaneados.

Figura 10 (relacionada con la figura 3): Análisis continuado de los organoides tumorales CNS-PNET tras el tratamiento con artemisinina y 5-ALA **A** Cuantificación de la Caspasa 3 (Casp3) y **B** Células Ki67-positivas en los organoides tumorales tratados con 5-ALA y artemisinina. Por condición y grupo, se teñieron 3 organoides, 6 secciones cada uno, con Caspase3 o Ki67, se tomaron imágenes utilizando un escáner fluorescente de alta magnificación, y se eligieron y analizaron 25 regiones de interés (ROI 2,500 μ m²). El número de células Casp3 o Ki67 positivas se normalizó con respecto al área analizada (por ROI, GFP+ o GFP-) y se muestra como gráficos de caja (mediana, percentiles 25-75). **C** Imágenes representativas de secciones teñidas con anti-Casp3, anti-GFP y DAPI. Barra de escala 50 μ m.

Figura 11 (relacionada con la Figura 4): Tratamiento combinado con artemisinina y 5-ALA de modelos de organoides neoplásicos humanos similares a glioblastomas **A** Imágenes de fluorescencia de organoides tumorales cerebrales tratados con 5-ALA y artemisinina. Se controlaron los organoides en d1, d5, d8 y d11. Barra de escala 500 μ m. **B** Análisis de imagen y cuantificación del área tumoral GFP-positiva de los organoides tratados. Los organoides se analizaron en d8 y se normalizaron con respecto a d1. Los datos se muestran como diagramas de caja (percentiles 25-75, mediana).

Figura 12: La artemisinina (ART) y sus derivados Dihidroartemisinina (DHA) y Artesunato (ARS) ejercen efectos antiproliferativos sinérgicos sobre líneas celulares de glioblastoma y células madre embrionarias de ratón (ESC) cuando se combinan con ácido 5-aminolevulínico (5-ALA). Se muestran curvas de valoración de 6 días de compuestos de artemisinina y 5-ALA. **A-R** Supervivencia celular de las líneas de glioblastoma tratadas con 5-ALA (como se indica) y ESC en combinación con las dosis indicadas **A, D, G, J, M, P** ART, o **B, E, H, K, N, Q** DHA, o **C, F, I, L, O, R** ARS en comparación con los controles no tratados. Los valores son la media \pm SEM de \geq 3 experimentos independientes. Las líneas de puntos marcan el 100% de supervivencia.

Figura 13: ART o DHA combinados con 5-ALA aumentan el efecto anti proliferativo del tratamiento con Temozolomida (TMZ) en líneas celulares de glioblastoma y ESC. **A-L** Líneas de glioblastoma tratadas con 5-ALA y TMZ (como se indica) y ESC en combinación con las dosis indicadas **A, C, E, G, I, K** de ART o **B, D, F, H, J, L** de DHA en comparación con los controles no tratados. Los valores son la

media +SEM de ≥ 5 experimentos independientes. Las líneas de puntos marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia tras el tratamiento con TMZ únicamente.

Figura 14: ARS combinada con 5-ALA o Metil-5-ALA aumenta el efecto antiproliferativo del tratamiento con Temozolomida (TMZ) en líneas celulares de glioblastoma y ESC. El 5-ALA es más potente que el Metil-5-ALA en esta configuración.

A-F Líneas de glioblastoma tratadas con 5-ALA y TMZ (como se indica) y ESC en combinación con las dosis de ARS indicadas en comparación con los controles no tratados. Los valores son la media +SEM de ≥ 3 experimentos independientes. Las líneas de puntos marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia tras el tratamiento con TMZ únicamente.

Figura 15: ART combinado con 5-ALA aumenta el efecto antiproliferativo del tratamiento con Lomustina (CCNU) en líneas celulares de glioblastoma y ESC.

A-F Líneas de glioblastoma tratadas con 5-ALA y CCNU (como se indica) y ESC en combinación con dosis de ART comparadas con controles no tratados. Los valores son la media +SEM de ≥ 4 experimentos independientes. Las líneas discontinuas marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia con tratamiento de CCNU únicamente.

Figura 16: ART, DHA o ARS combinados con 5-ALA aumentan el efecto anti proliferativo del tratamiento con cisplatino (CP) y 5-fluorouracilo (5-FU) en dos líneas celulares de cáncer de pulmón.

A-L Supervivencia celular de las líneas de cáncer de pulmón tratadas con 5-ALA (según se indica) en combinación con las dosis indicadas de **A, D, G, J** ART, o **B, E, H, K**, dosis de DHA, o **C, F, I, L**, dosis de ARS y acondicionamiento con cisplatino (**A-F**) o 5-FU (**G-L**) en comparación con los controles no tratados. Los valores son la media +SEM de ≥ 4 experimentos independientes. Las líneas discontinuas marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia con tratamiento quimioterapéutico (cisplatino o 5-FU) únicamente.

Figura 17: ART, DHA o ARS combinados con 5-ALA aumentan el efecto anti proliferativo del tratamiento con cisplatino (CP) y 5-fluorouracilo (5-FU) en células HepG2 (cáncer de hígado).

A-F Supervivencia celular de las células HepG2 tratadas con 5-ALA en combinación con las dosis **A, D**, ART indicadas, o **B, E**, dosis DHA, o **C, F**, dosis ARS y acondicionamiento con cisplatino (**A-C**) o 5-FU (**D-F**) en comparación con los controles no tratados. Los valores son la media +SEM de ≥ 4 experimentos independientes. Las líneas discontinuas marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia con tratamiento quimioterapéutico (cisplatino o 5-FU) únicamente.

Figura 18: ART, DHA o ARS combinados con 5-ALA aumentan el efecto anti proliferativo del tratamiento con cisplatino y 5-fluorouracilo (5-FU) en células MD-MBA-231 (cáncer de mama).

A-F Supervivencia celular de las células MD-MBA-231 tratadas con 5-ALA en combinación con las dosis **A, D**, ART indicadas, o **B, E**, dosis DHA, o **C, F**, dosis ARS y acondicionamiento con cisplatino (**A-C**) o 5-FU (**D-F**) en comparación con los controles no tratados. Los valores son la media +SEM de ≥ 4 experimentos independientes. Las líneas discontinuas marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia con tratamiento quimioterapéutico (cisplatino o 5-FU) únicamente.

Figura 19: ART, DHA o ARS combinados con 5-ALA aumentan el efecto antiproliferativo del tratamiento con cisplatino y 5-fluorouracilo (5-FU) en células MiaPaca-2 (cáncer de páncreas).

A-F Supervivencia celular de las células MiaPaca-2 tratadas con 5-ALA en combinación con las dosis **A, D**, ART indicadas, o **B, E**, dosis DHA, o **C, F**, dosis ARS y acondicionamiento con cisplatino (**A-C**) o 5-FU (**D-F**) en comparación con los controles no tratados. Los valores son la media +SEM de ≥ 4 experimentos independientes. Las líneas discontinuas marcan la supervivencia del 100% y la supervivencia con tratamiento quimioterapéutico (cisplatino o 5-FU) únicamente.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Cultivo de tejidos de mamíferos

[0161] Los clones de células madre embrionarias de ratón (clon AN3-12) {Elling:2011gla} se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), penicilina-estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico (1 mM), L-glutamina (2 mM), β -mercaptoetanol (0,1 mM) y LIF (20 μ g ml⁻¹). Las células SH-SY5Y se cultivaron en DMEM/F12 1:1 suplementado con un 10% de FCS (suero fetal de ternera), penicilina-estreptomicina y L-glutamina. Las células 4T1 se cultivaron en IMDM suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (FCS), penicilina-estreptomicina y L-glutamina. Las células MEF, Mcf7, MDA-MB-231, Panc1, LN229, A549, MiaPaca-2, B16F10 y PlatE se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FCS, penicilina-estreptomicina y L-glutamina. Las células HepG2-, T98G- y U87MG se cultivaron en EMEM, y las células SHP77-, VBT92- y VBT281 se cultivaron en RPMI, cada una de ellas suplementada con un 10% de FCS, penicilina-estreptomicina y L-glutamina. Todas las células se cultivaron a 37°C, con 20%O₂ y 5%CO₂.

Líneas celulares

[0162] Las líneas ESC de ratón AN3-12 se generaron en nuestro laboratorio y se caracterizaron y autentificaron como se describió previamente {Elling, U. et al. Genética directa e inversa mediante la derivación de células madre embrionarias haploides de ratón. *Cell stem cell* 9, 563-574 (2011)}. Las ESC murinas haploides se utilizaron para la mutagénesis insercional y la derivación de líneas celulares *knockout* de trampas genéticas. SH-SY5Y se obtuvieron directamente del proveedor (Sigma Aldrich) y se utilizaron para ensayos de crecimiento y tinciones celulares. Las células Jurkat utilizadas en los ensayos de viabilidad *in vitro* y DHE se obtuvieron de una fuente interna y se describen funcionalmente en otra parte {Reikerstorfer, A., Holz, H., Stunnenberg, H. G. & Busslinger, M. Low affinity binding of interleukin-1 beta and intracellular signaling via NF-kappa B identify Fit-1 as a distant member of the interleukin-1 receptor family. *The Journal of biological chemistry* 270, 17645-17648 (1995)}. Las líneas celulares de cáncer Mcf7, MDA-MB-231, 4T1, Panc1 y B16F10 se obtuvieron internamente. Los MEF se generaron y obtuvieron en nuestro laboratorio. Las células PlatE se utilizaron para la producción de retrovirus recombinantes y lentivirus como se ha descrito previamente {Taubenschmid, J. et al. A vital sugar code for ricin toxicity. *Cell Research* 27, 1351-1364 (2017). Stadlmann, J. et al. Comparative glycoproteomics of stem cells identifies new players in ricin toxicity. *Nature* 549, 538-542 (2017)}. Todas las líneas celulares dieron negativo en las pruebas de micoplasma. No se utilizó ninguna línea celular incluida en la lista del ICLAC.

Ensayos de crecimiento competitivo

[0163] Las ESC haploides que albergaban trampas génicas en intrones nómicos se sembraron a baja densidad en medio de crecimiento normal de ESC y se infectaron durante 12h con dos virus, uno que codificaba mCherry más recombinasa Cre y otro que codificaba GFP, ambos junto con puromicina (Invitrogen, ant-pr-1). Las células infectadas se seleccionaron (concentración final de puromicina, 1 µg/ml) al cabo de 24h y se expandieron. Se determinaron las proporciones de células que expresaban GFP y mCherry/Cre en presencia y ausencia de artemisinina mediante citometría de flujo de alto rendimiento (BD LSRFortessa HTS Cell Analyzer).

Perfiles de compuestos en líneas celulares

[0164] Para las respuestas de dosificación, se sembraron células en 96 pocillos (25.000/ 96 pocillo, por triplicado - donde se indica) y se sometieron a los compuestos durante 48h. La viabilidad celular se evaluó mediante recuento celular automatizado (citometría de flujo de alto rendimiento), tinción con azul Alamar (Invitrogen, DAL1100) o ensayo luminiscente CellTiter-Glo (Promega, G7570, según el protocolo del fabricante), respectivamente.

[0165] Los ensayos de supervivencia celular (Figuras 12-19) se realizaron en placas de 96 pocillos en duplicados técnicos. Los tratamientos se iniciaron 24 horas después de la siembra y se prolongaron durante 6 días antes de evaluar la viabilidad celular con el ensayo luminiscente Cell Titer Glo 2.0 (Promega, G9242).

Tinción con dihidroetidio (DHE)

[0166] Las células tratadas se recogieron, se lavaron con 1x HBSS (sin Ca²⁺ y Mg²⁺), se incubaron con 1mM DHE (Dihidroetidio (Hidroetidina), Invitrogen, D11347) en 1x HBSS durante 45min a 37°C, se lavaron dos veces y se contrataron con DAPI o un colorante de viabilidad (eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, 65-0865-18) durante 10min en hielo. A continuación, se recogieron las células, se colaron y se analizaron mediante citometría de flujo en busca de DHE en el espectro rojo fluorescente (canal PE).

Tinción JC-1

[0167] Se recogieron las células, se lavaron con 1xPBS, se incubaron con 2µM de JC-1 en 1PBS (MitoProbe JC-1 Assay Kit-1, Invitrogen, M34152) durante 35min a 37°C, se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo en el espectro de fluorescencia rojo (canal PE) y verde (canal FITC).

Formación de organoides cerebrales

[0168] Los organoides cerebrales se generaron como se ha descrito anteriormente {Lancaster, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373-379 (2013)}. Las células madre embrionarias humanas (WiCell, H9 no alimentadoras) se transfirieron a placas de 96 pocillos de baja adherencia (Corning) en una densidad de 9.000 células por pocillo y se incubaron en medio de células madre humanas. Después de 6 días, el medio se cambió a un medio de inducción neural, que contenía medio de águila modificado de Dulbecco DMEM/F12, suplemento N2 (Invitrogen), Glutamax (Invitrogen), medio esencial mínimo-aminoácidos no esenciales (MEM-NEAA) y 1µg/ml de heparina (Sigma), para promover el crecimiento del tejido ectodérmico. El día 11, los cuerpos embrionarios (EBs) se incrustaron en gotitas de Matrigel y se transfirieron a medio de diferenciación, que contenía DMEM/F12: Neurobasal 1:1, suplemento N2 (Invitrogen), suplemento B27 (sin vitamina A) (Invitrogen), 50µM 2-mercaptoetanol, insulina 1:4.000 (Sigma), Glutamax (Invitrogen), penicilina-estreptomina, MEM-NEAA en placas de 10 cm. 5 días después, los organoides se transfirieron a un agitador orbital y se mantuvieron en medios de diferenciación que contenían vitamina A (en suplemento B27).

Formación de organoides tumorales cerebrales + Nucleofección

[0169] La iniciación de tumores se indujo mediante la amplificación de oncogenes, utilizando una transposasa Sleeping Beauty (SB), o la mutación de genes supresores de tumores, utilizando el sistema CRISPR-Cas9 en cuerpos embrioides (EB) de 10 días de edad. Se introdujeron por electroporación plásmidos portadores de la transposasa, así como de GFP y los oncogenes deseados, o que expresaban la nucleasa Cas9. En resumen, se añadió una mezcla de 1µg de ADN y 100µl de solución nucleofectora a 10 EB y se transfirió a una cubeta de nucleofección. Para la electroporación/nucleofección se utilizaron el Lonza Nucleofector 2b y el programa A-023. A continuación, las EB se transfirieron a placas de 10 cm que contenían medios de diferenciación con vitamina A y se incrustaron en Matrigel 24 horas después. Se iniciaron dos tipos diferentes de tumores {Bian:2018gs}: Los tumores neuroectodérmicos primitivos del sistema nervioso central (CNS-PNET) fueron inducidos por la sobreexpresión de Myc. El tumor tipo glioblastoma grupo 2 (GBM-2) fue causado por mutagénesis de los genes supresores de tumores p53, NF1 y PTEN. Todos los plásmidos fueron diseñados por Shan Bian {Bian, S. et al. Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. Nat. Methods 15, 631-639 (2018)}.

Perfiles de compuestos en organoides tumorales cerebrales

[0170] Se trataron organoides tumorales cerebrales con diferentes compuestos y se monitorizó la supervivencia y el crecimiento de neuronas transformadas y no transformadas. La marcación fluorescente de las células tumorales permitió distinguir claramente las células transformadas de las no marcadas a lo largo de todo el experimento mediante microscopía de campo claro, así como mediante imágenes de fluorescencia. El tejido tumoral transformado y las neuronas no transformadas dentro del mismo organoide se monitorizaron utilizando imágenes de fluorescencia, así como microscopía de campo claro durante todo el experimento. Al final del tratamiento (d5 o d7 respectivamente), se evaluó el número de células GFP-positivas mediante citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo de organoides tumorales cerebrales

[0171] Los organoides cerebrales (tumorales) se disociaron enzimática y mecánicamente utilizando 1x tripsina, 35-45min de incubación a 37°C y agitación suave. Los organoides se singularizaron mediante resuspensión cuidadosa, adición de medio de diferenciación y colado (Tubos Falcon de fondo redondo con tapón colador celular, 5 mL, malla de nylon de 35 µm tapón a presión colador celular). Las células individuales en suspensión se contrateñían con DAPI o un colorante de viabilidad (eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780, 65-0865-18), y se analizaban mediante citometría de flujo (BD LSRFortessa HTS Cell Analyzer). Se analizaron las cantidades de células positivas para GFP.

Imagen de organoides tumorales cerebrales

[0172] Los organoides cerebrales tratados con 5-ALA o Artemisinina fueron visualizados en los puntos temporales indicados utilizando el sistema de Microscopio Invertido Axio Vert.A1 (Zeiss Objetivo EC Plan-Neofluar 2.5x/0.085 Pol M27, adaptador de cámara 0.5). Se tomaron imágenes de campo claro y de fluorescencia verde de la misma zona. Además, para el análisis de imágenes se utilizó el Celldiscoverer 7 (Zeiss), un sistema automatizado de imágenes de células vivas de alta gama totalmente integrado.

Tinción inmunohistoquímica

[0173] Los organoides cerebrales se fijaron en PFA al 4% (temperatura ambiente, 1h), se incubaron con sacarosa al 30% (4°C, o/n), se incrustaron en OCT (Tissue-tek OCT Compound, SANOVA PHARMA GESMBH, 4583) y se cortaron con criostato secciones de 20µm (-12/-14°C). Para la tinción, las secciones se bloquearon y permeabilizaron durante 1 h a temperatura ambiente en Tritón X-100 al 0,25%, suero de burro al 4% en PBS, se tiñeron con anticuerpos primarios diluidos en Tritón X-100 al 0,1%, suero de burro al 4% en PBS a temperatura ambiente durante la noche, se incubaron con anticuerpos secundarios diluidos en Tritón X-100 al 01% de Tritón X-100, 4% de suero de burro en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y teñidos con DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dilactate, Invitrogen, D3571) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se utilizó medio de montaje de fluorescencia (Dako, S302380) para montar los portaobjetos de las muestras. Se tomaron imágenes de los organoides en un LSM780 Axio Imager (microscopio confocal de barrido láser puntual, detectores GaAsP (arseniuro de galio) con QE del 45% y SNR de hasta 2 veces) con un conjunto de filtros estándar (CH1: 371-735, CH2: 479-735, CH3 Quasar (GaAsP): 416-690) a través de un objetivo 20x/0,8 plan-Apochromat (Carl Zeiss) utilizando iluminación láser (Diodo láser 405 - 25mW, Argón 458, 488, 514 - 30mW, DPSS 561 - 15mW, HeNe 633 - 5mW).

Estadísticas y reproducibilidad

[0174] Todos los valores de las Figuras 1-11 se expresan como media ± SD, a menos que se indique lo contrario. Todos los experimentos se reprodujeron de dos a siete veces independientes, con resultados similares.

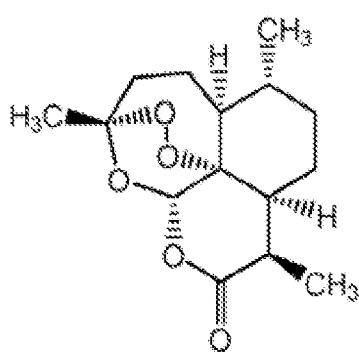
[0175] Se utilizó GraphPad Prism para generar figuras y realizar análisis estadísticos (GraphPad Software). No se realizó una estimación *a priori* del tamaño de la muestra. Los experimentos no fueron aleatorizados. Los investigadores no estaban cegados respecto a la asignación durante los experimentos y la evaluación de los resultados. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student no emparejada de dos colas, según se indica. P < 0,05 se aceptó como

estadísticamente significativo. Los gráficos de caja y bigotes representan la mediana y los intervalos del primer al tercer cuartil.

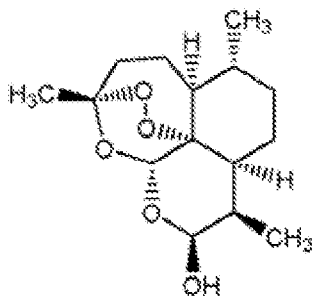
5 **[0176]** Para los datos representados en las Figuras 12-19, todos los valores se dan +SEM. Los datos se analizaron mediante la prueba t de Student emparejada de dos colas de acuerdo con la configuración experimental. La significación se indica como sigue: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

REIVINDICACIONES

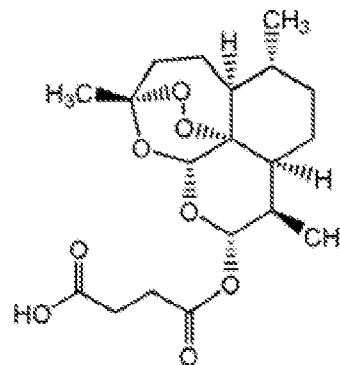
1. Una composición farmacéutica que comprende
 a) un compuesto de artemisinina (1) seleccionado entre



artemisinina (1a)



dihidroartemisinina (1b)



artesanato (1c)

o una sal, cocrystal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) ácido 5-aminolevulínico (2), ácido metil-5-aminolevulínico (2b), o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y

c) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo formado por temozolomida, lomustina, cisplatino y 5-fluorouracilo.

2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que una relación molar del compuesto de artemisinina (1) y el ácido 5-aminolevulínico (2) o el ácido metil-5-aminolevulínico (2b) está en un intervalo de 1:5 a 1:5000.

3. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en la que la composición farmacéutica comprende además un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

4. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón y preferentemente cáncer cerebral.

5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en la que la composición farmacéutica se presenta en forma de comprimido, cápsula, jarabe, solución, suspensión, emulsión o gel.

6. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en la que la composición farmacéutica se administra por vía oral, intratecal, intravenosa, subcutánea, parenteral o por inhalación.

7. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que el compuesto de artemisinina (1) se administra en un intervalo de 0,01 a 100 mg/kg por peso corporal y día y el ácido 5-aminolevulínico o el ácido metil-5-aminolevulínico se administra en un intervalo de 0,01 a 200 mg/kg por peso corporal y día.

8. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que el al menos un agente quimioterapéutico se administra en un intervalo de 0,01 a 100 mg/kg por peso corporal y día.

9. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 - 8, en la que el cáncer cerebral se selecciona entre los subtipos proneural (PN), mesenquimal (MES) y glioblastoma clásico (CL).

10. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 - 9, en la que la profilaxis y/o el tratamiento de cánceres hematopoyéticos, cáncer cerebral, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de mama y cáncer de pulmón y preferentemente cáncer cerebral se realiza en combinación con una radioterapia, inmunoterapia, terapia de campo electromagnético, terapia de hipertermia, quimioterapia, inmunoterapia del cáncer y/o cualquier otra terapia basada en moléculas pequeñas.

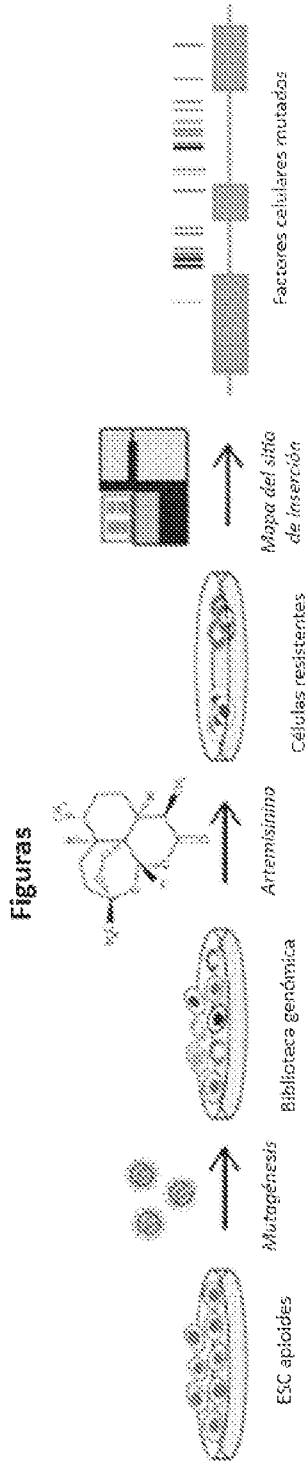
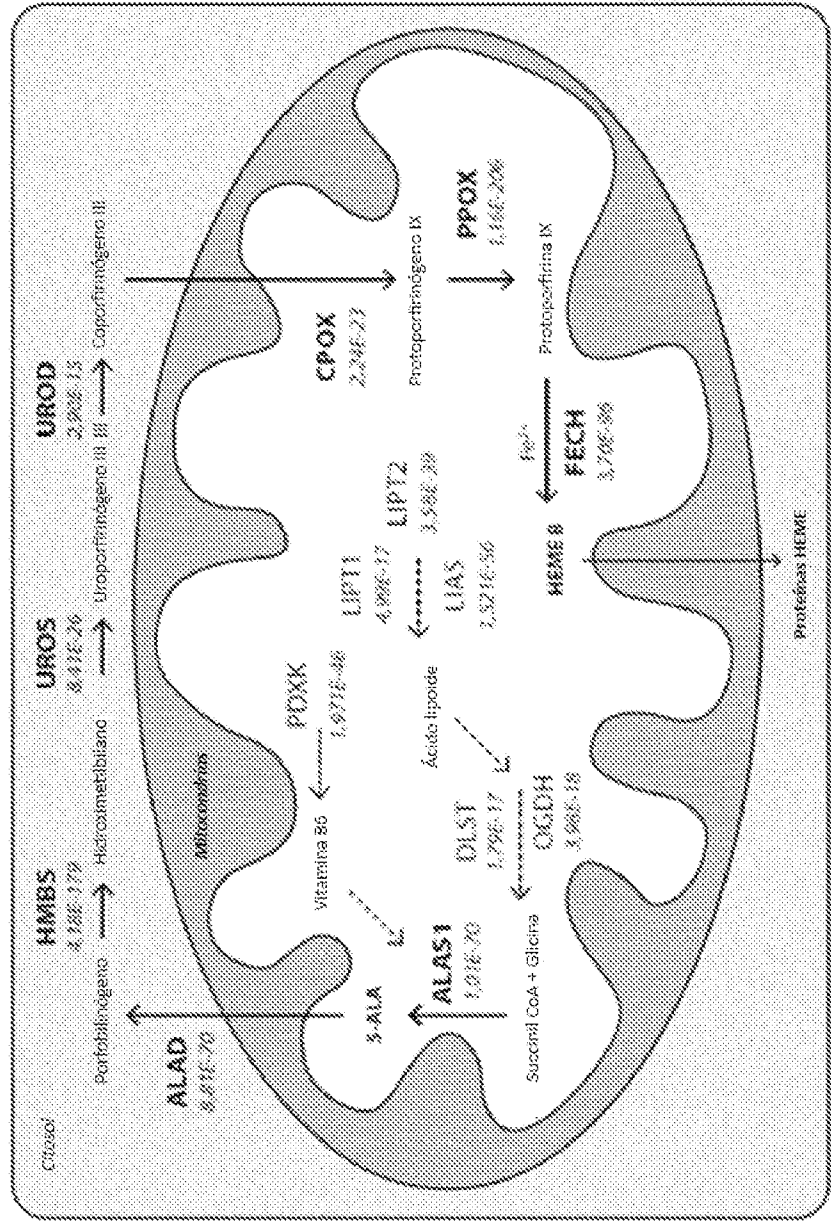


Figura 1 A

Biosíntesis de porfirinas



B

Figura 1 continuación



Figura 2

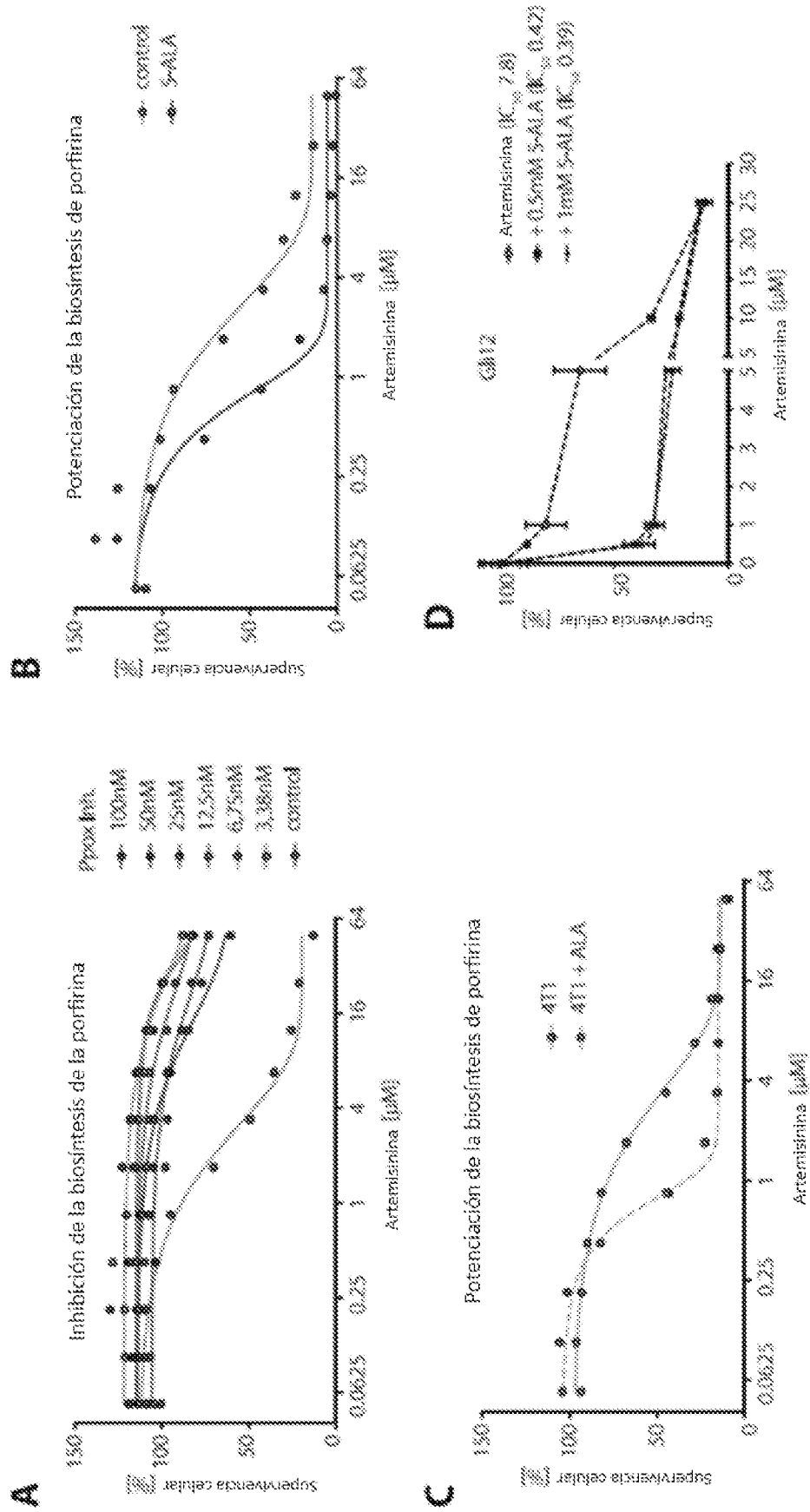


Figura 2 continuación

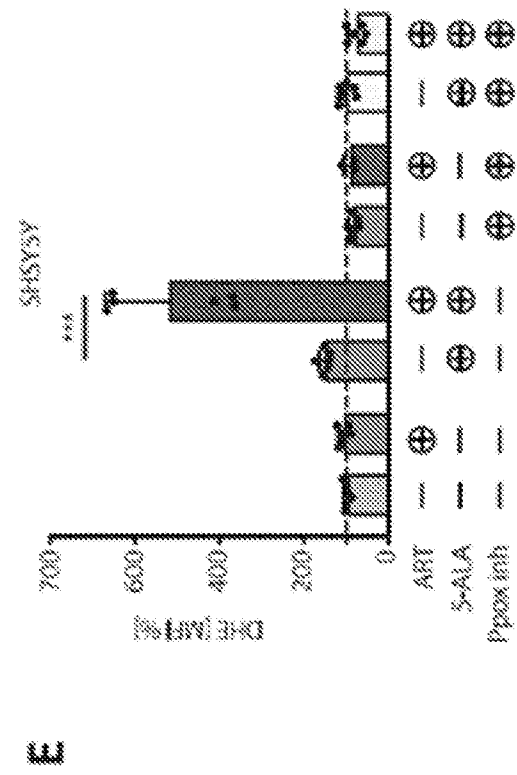
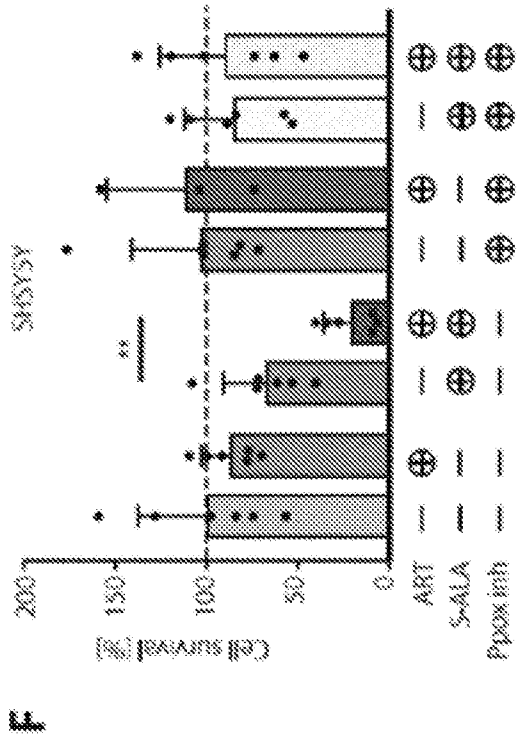


Figura 3

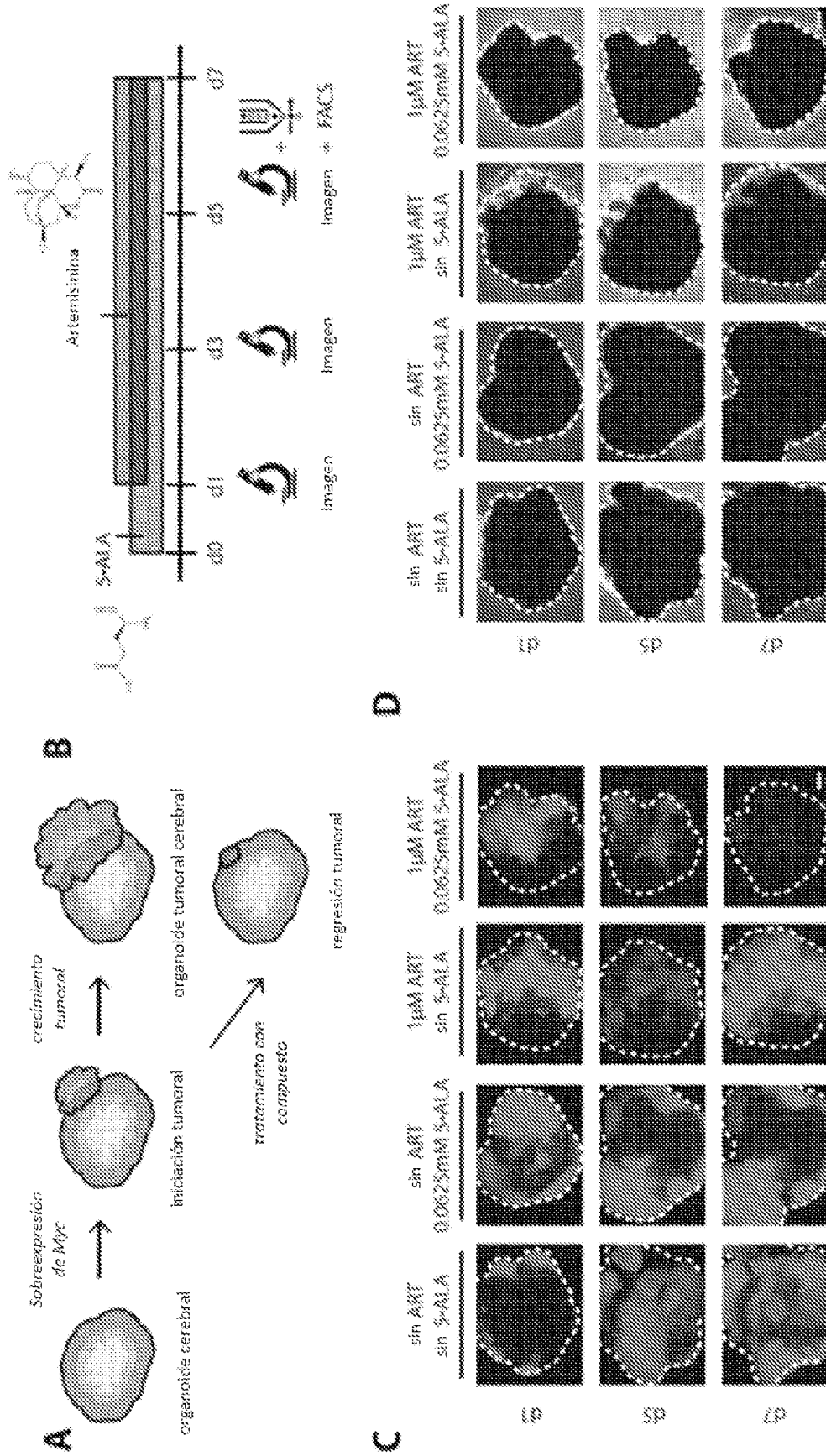


Figura 3 continuación

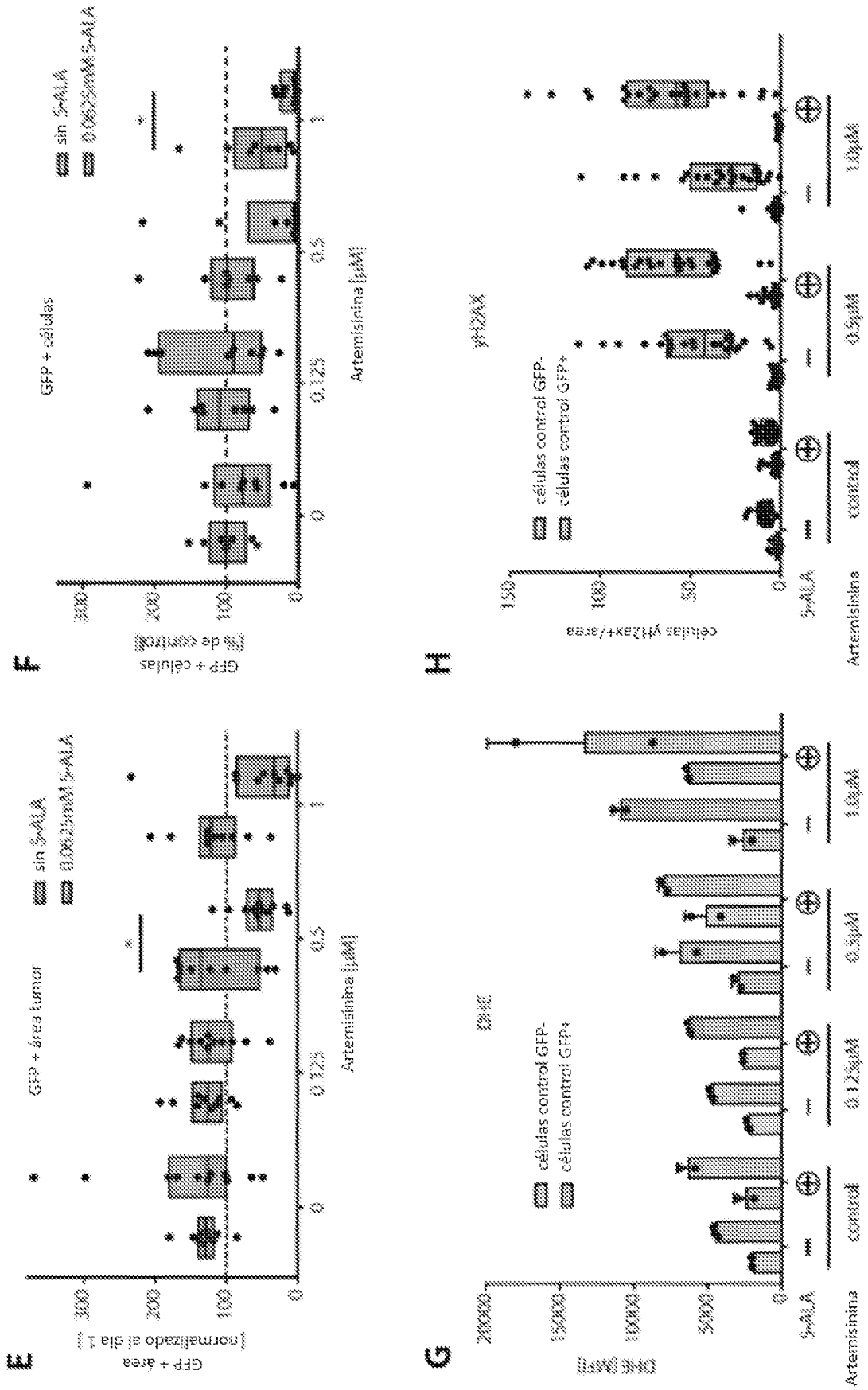
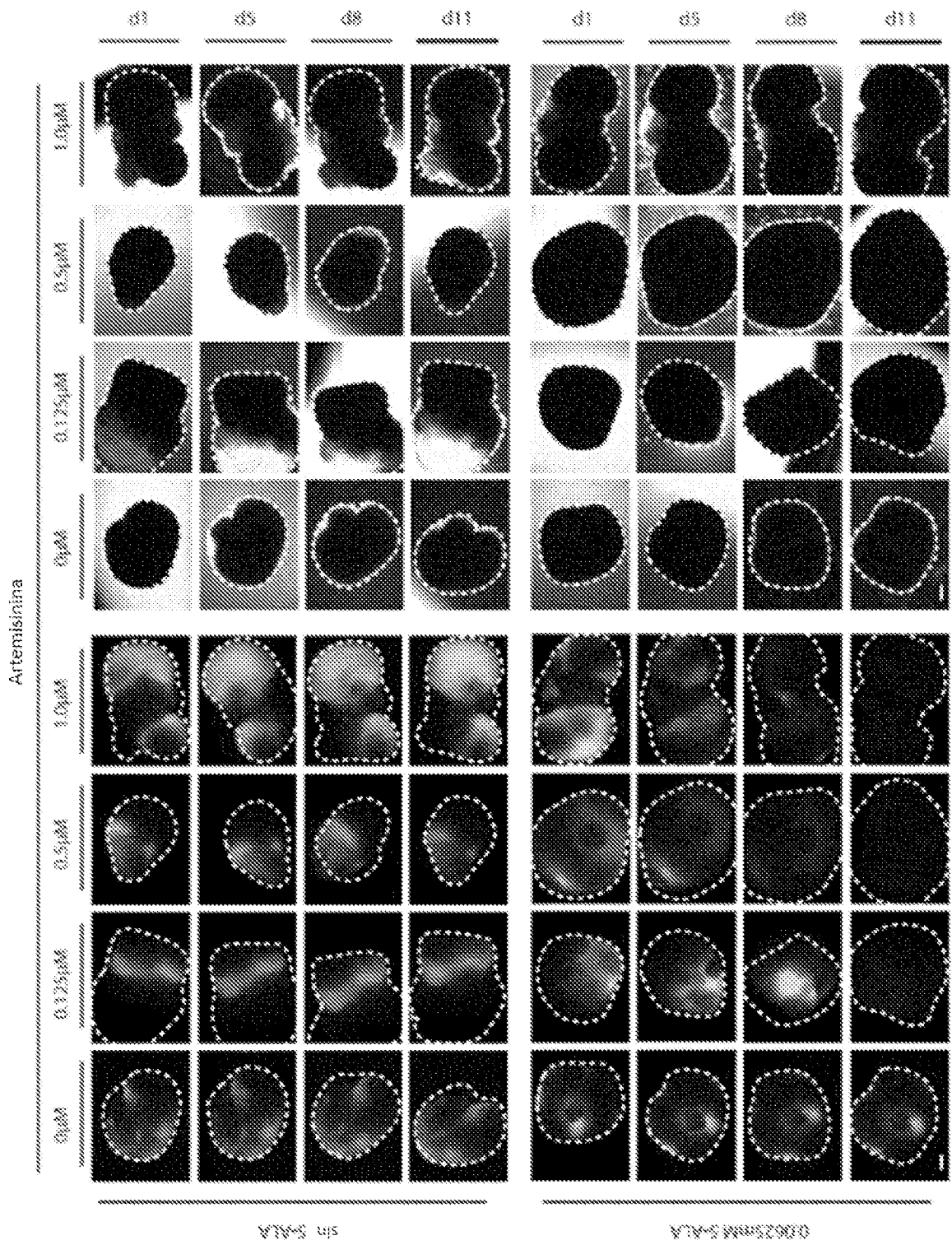


Figura 4



A

Figura 4 continuación

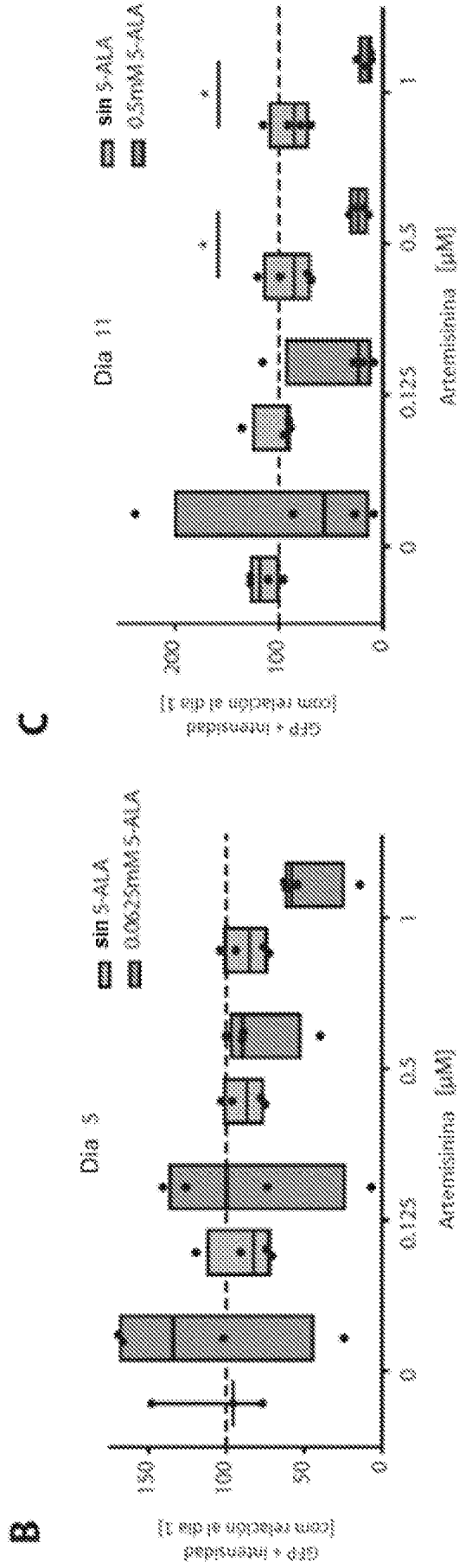


Figura 5

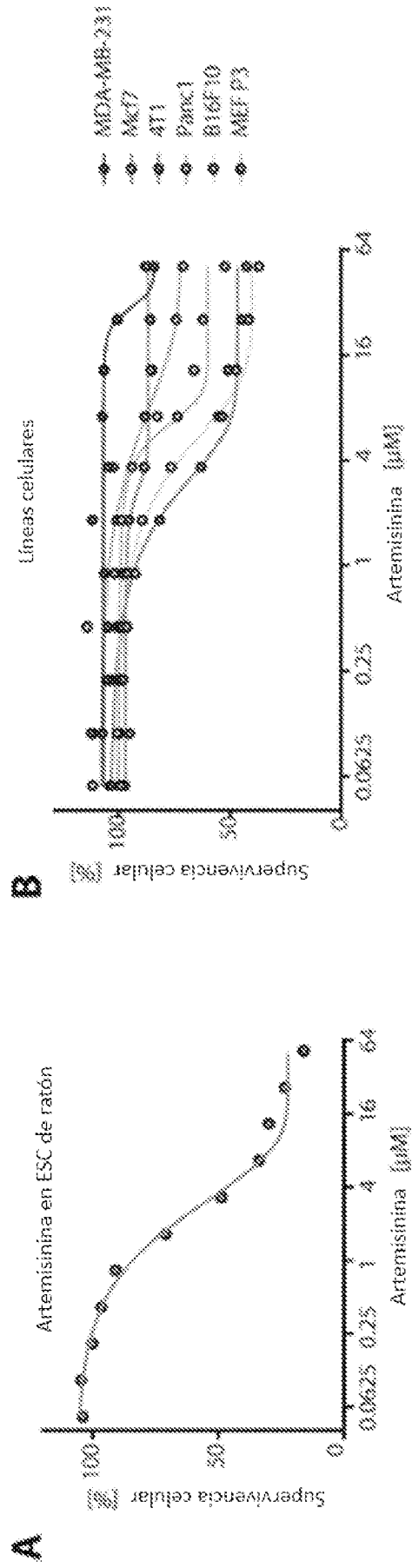


Figura 5 continuación

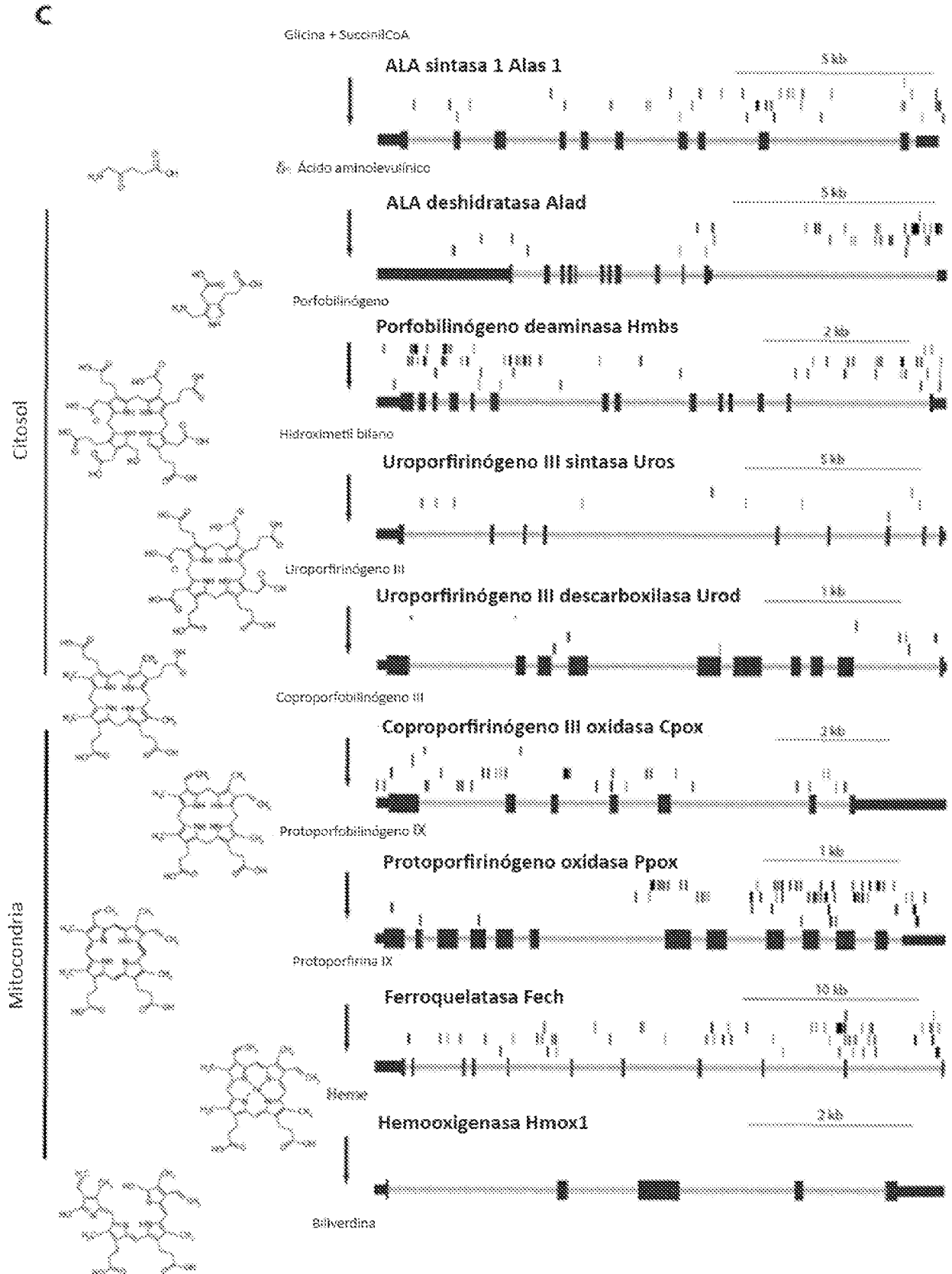


Figura 6

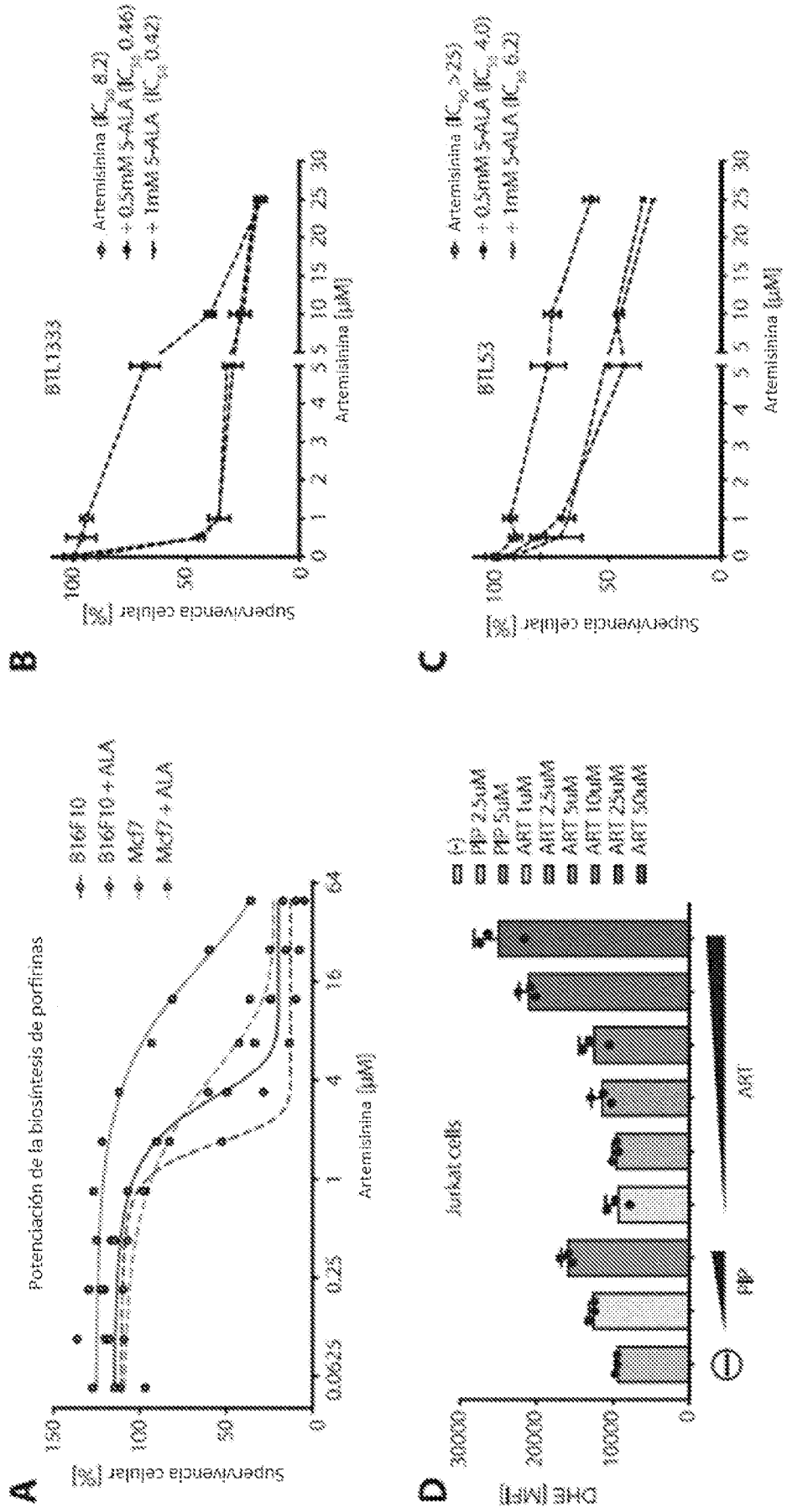


Figura 6 continuación

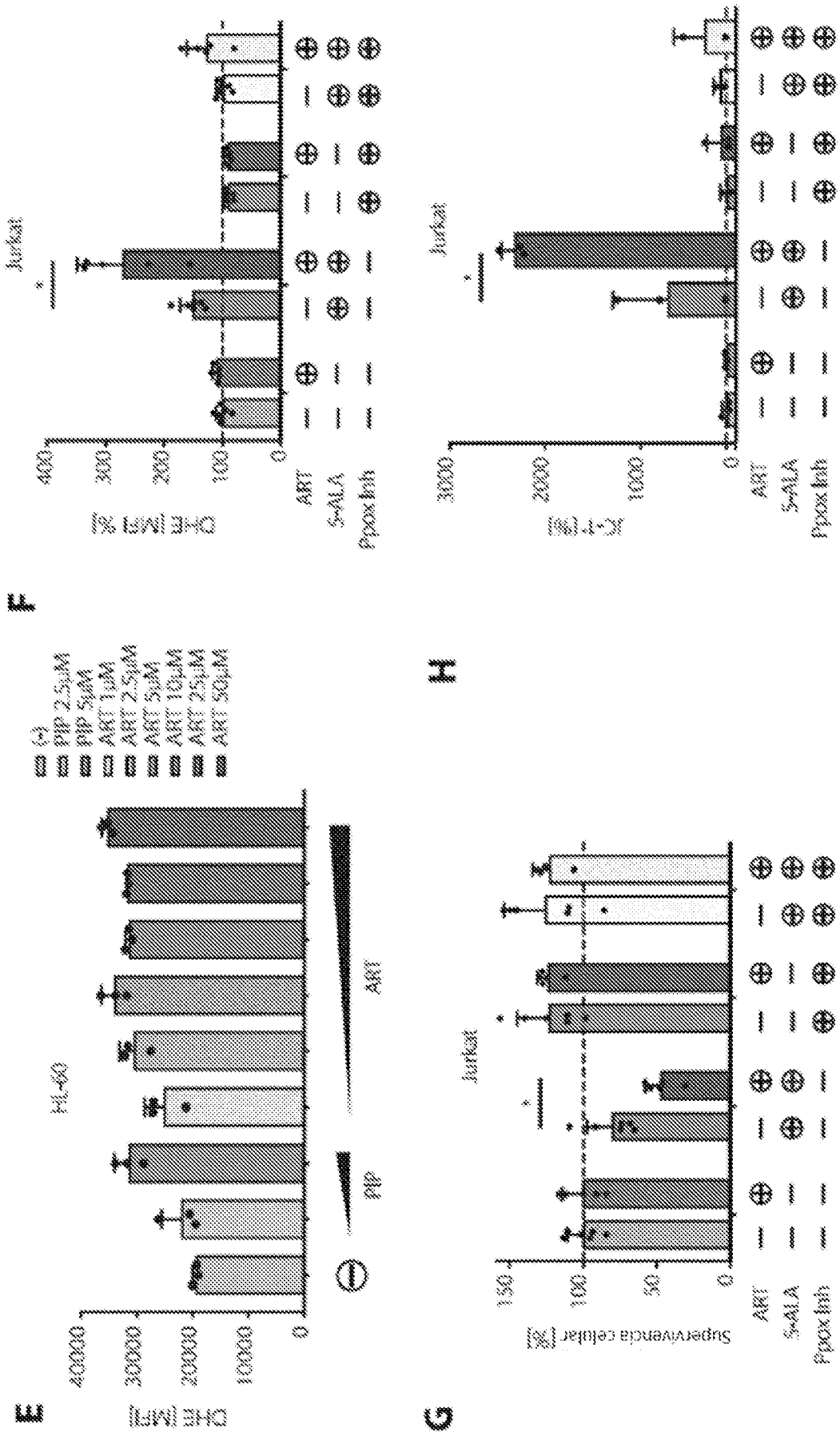


Figura 7

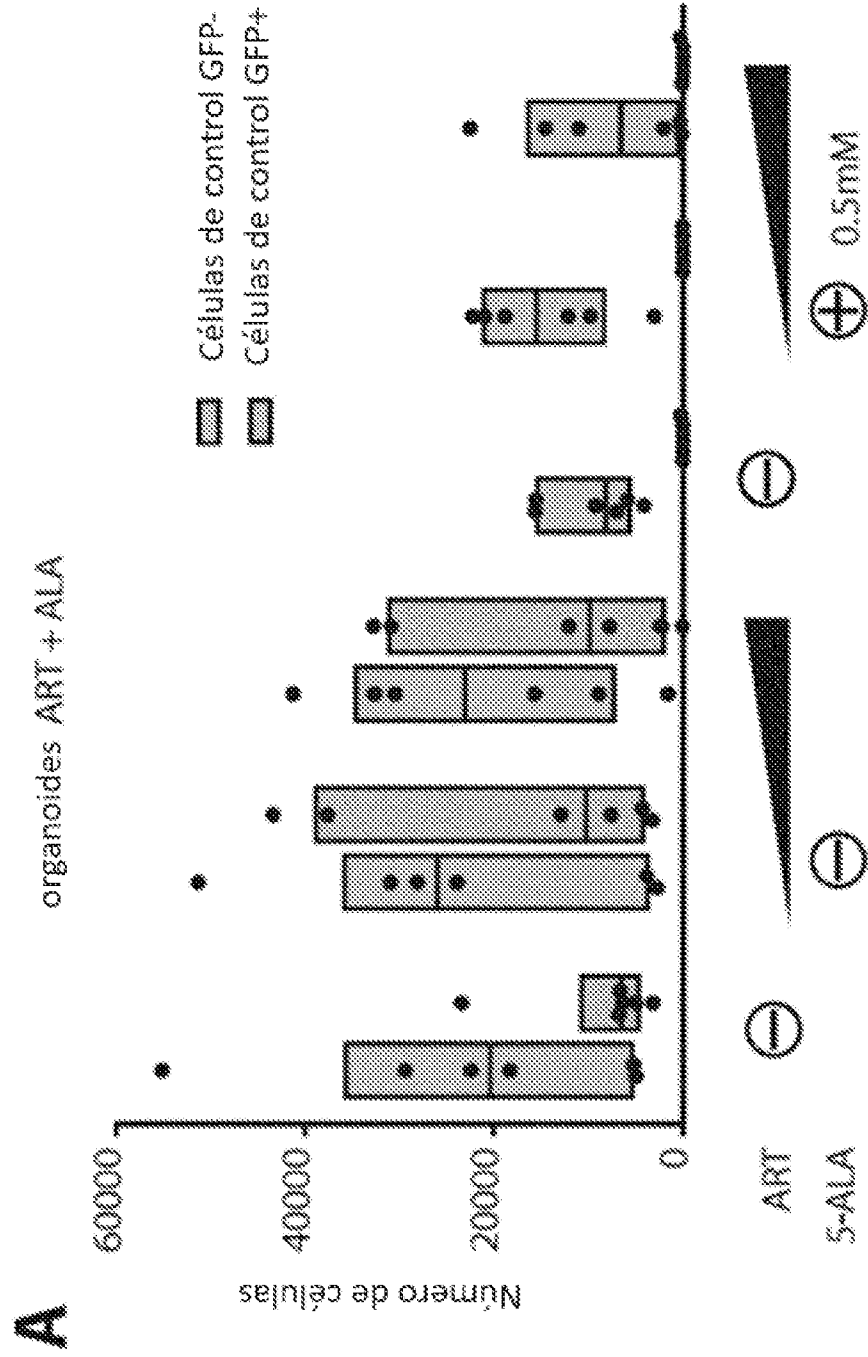


Figura 7 continuación

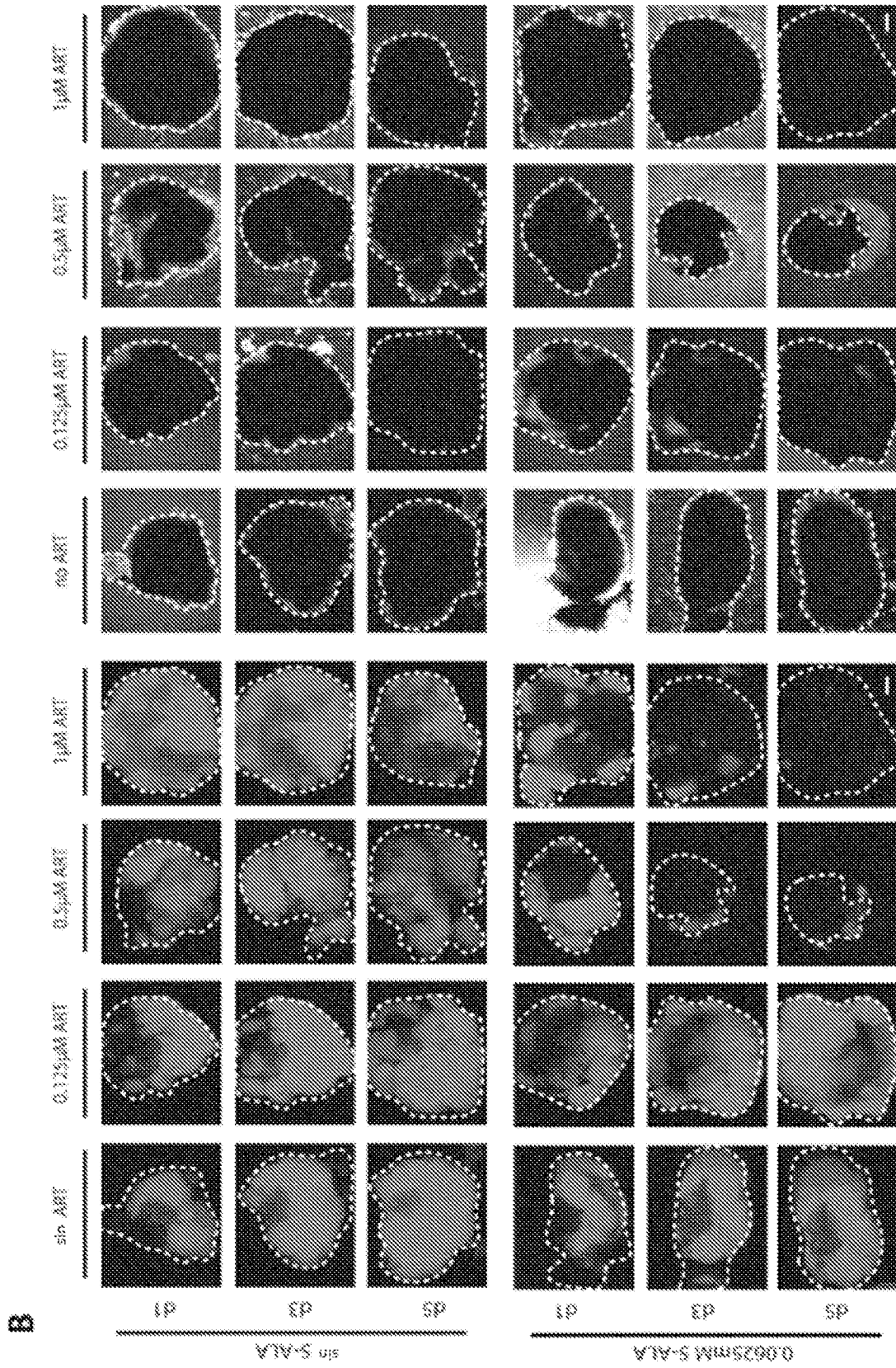


Figura 7 continuación

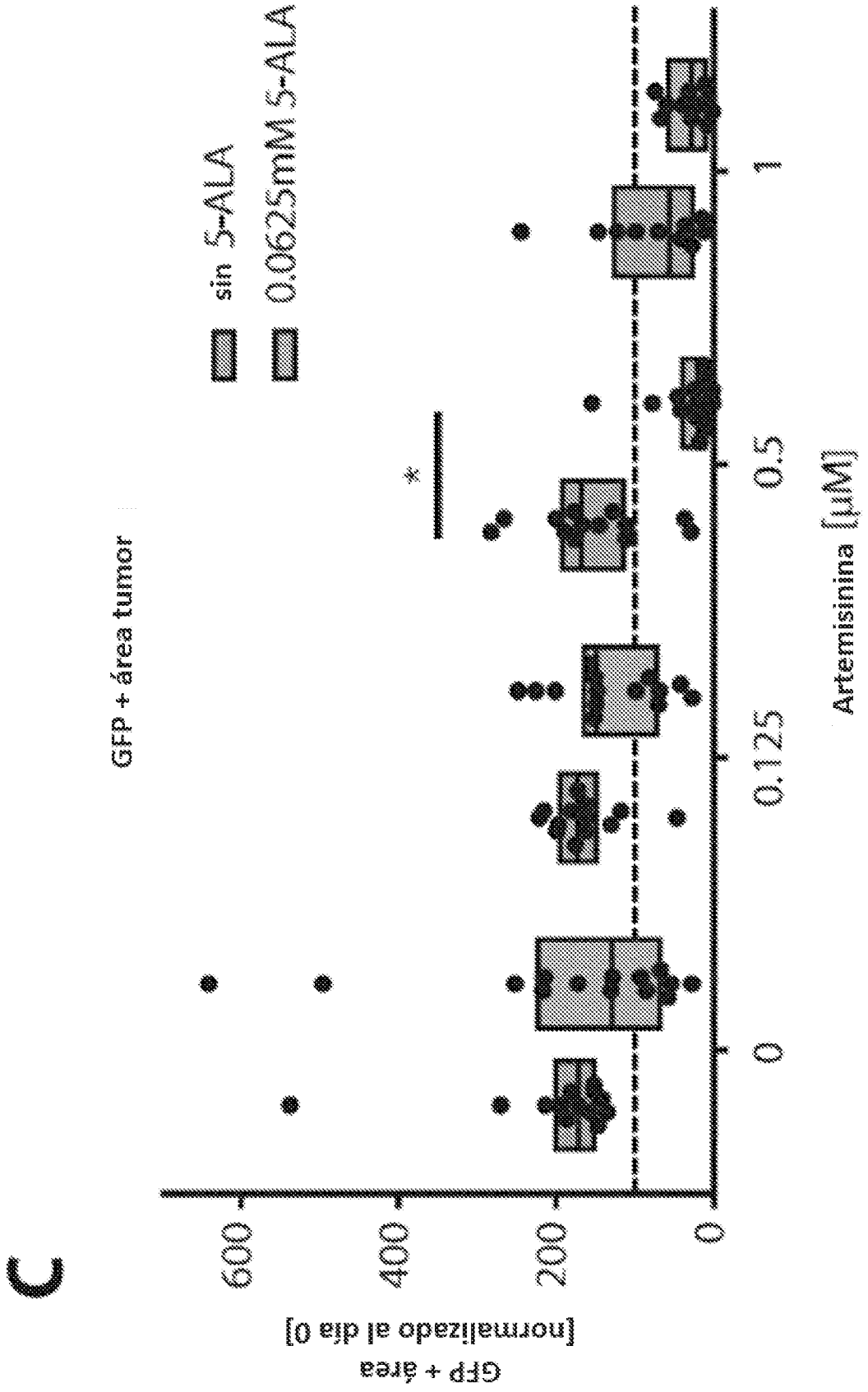
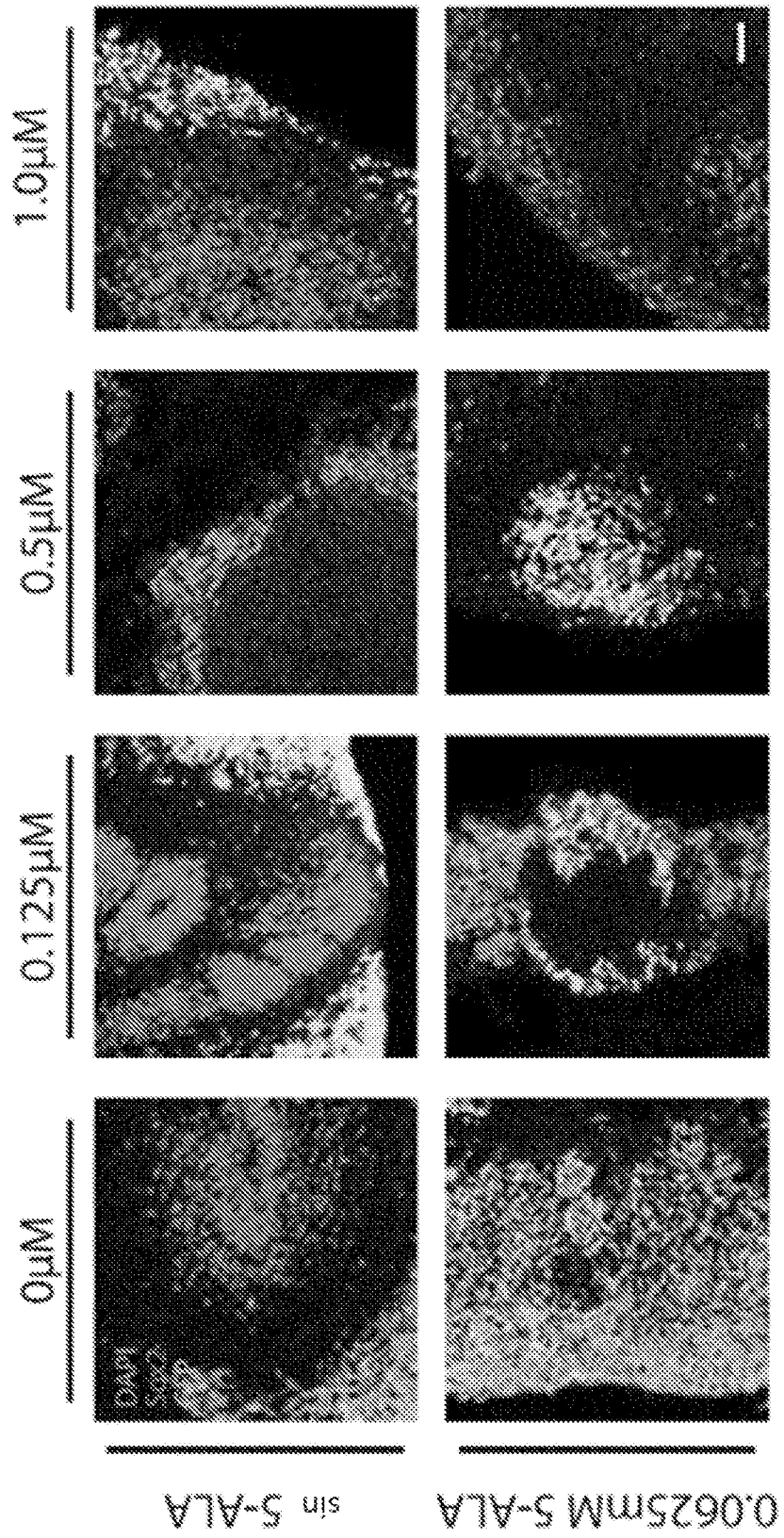


Figura 7 continuación



D

Figura 8

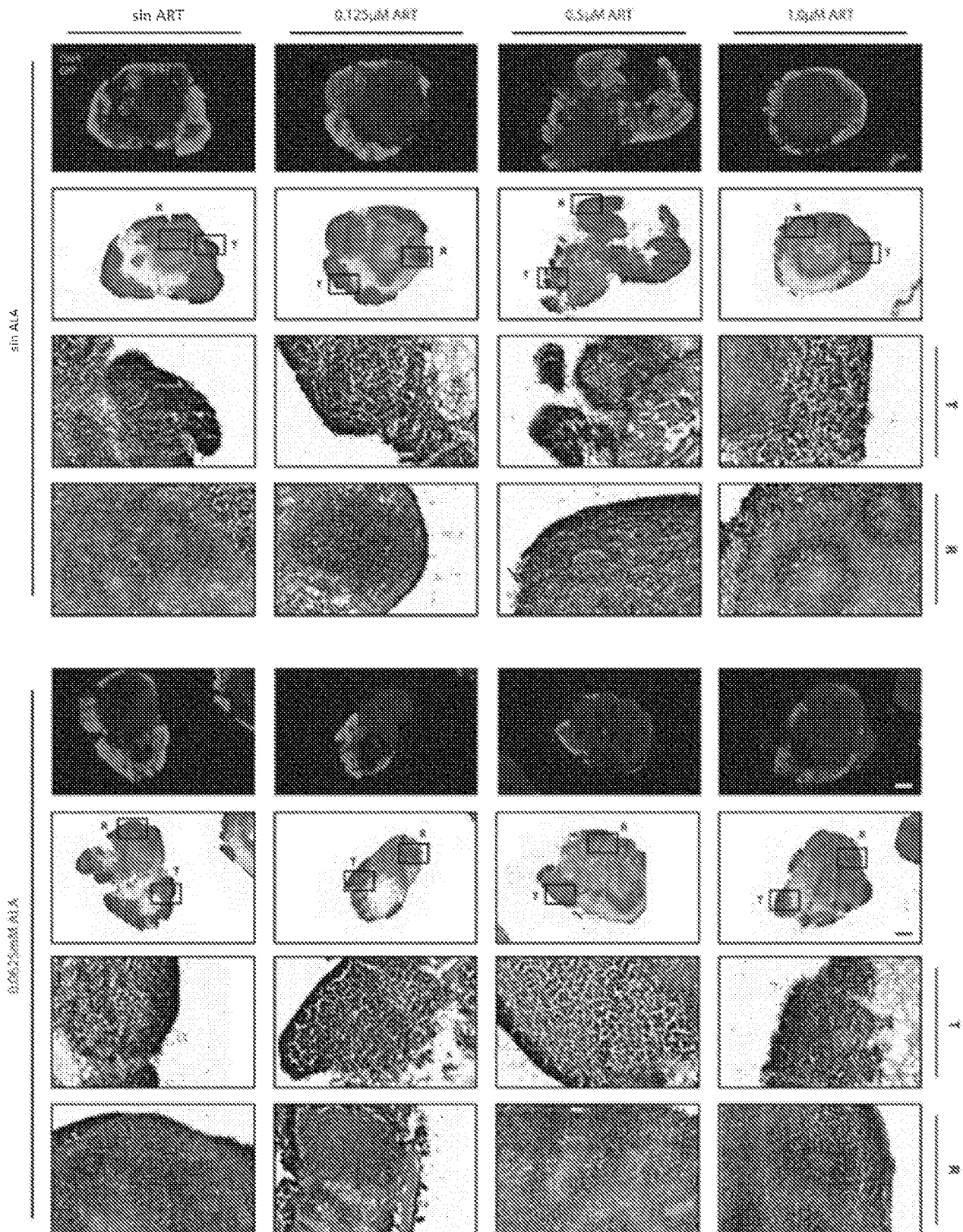


Figura 9

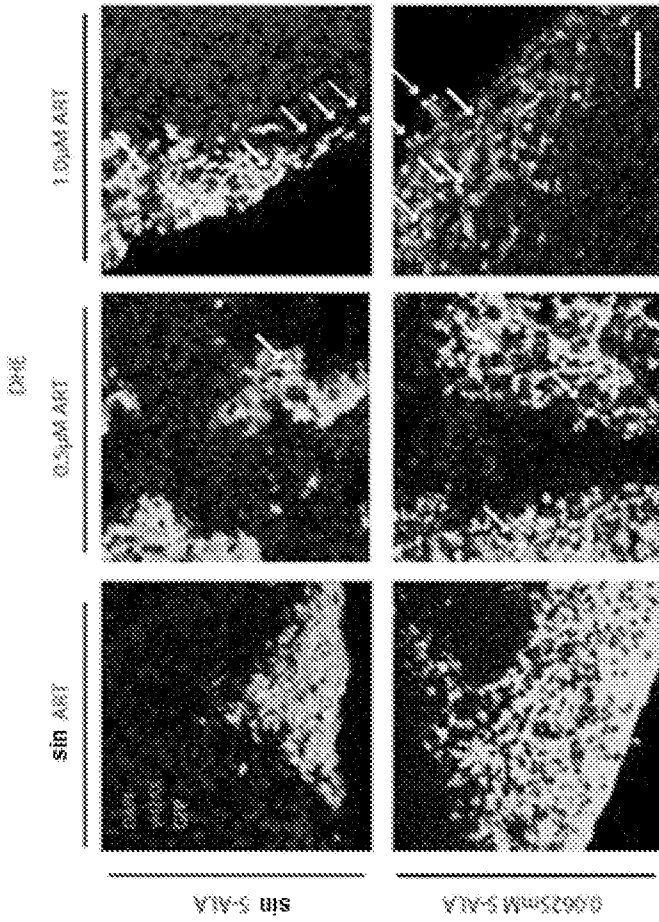
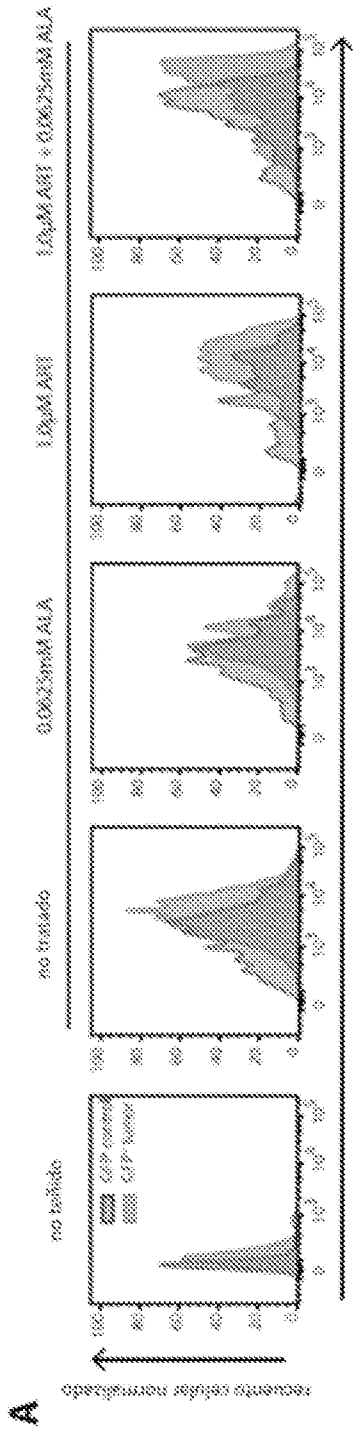
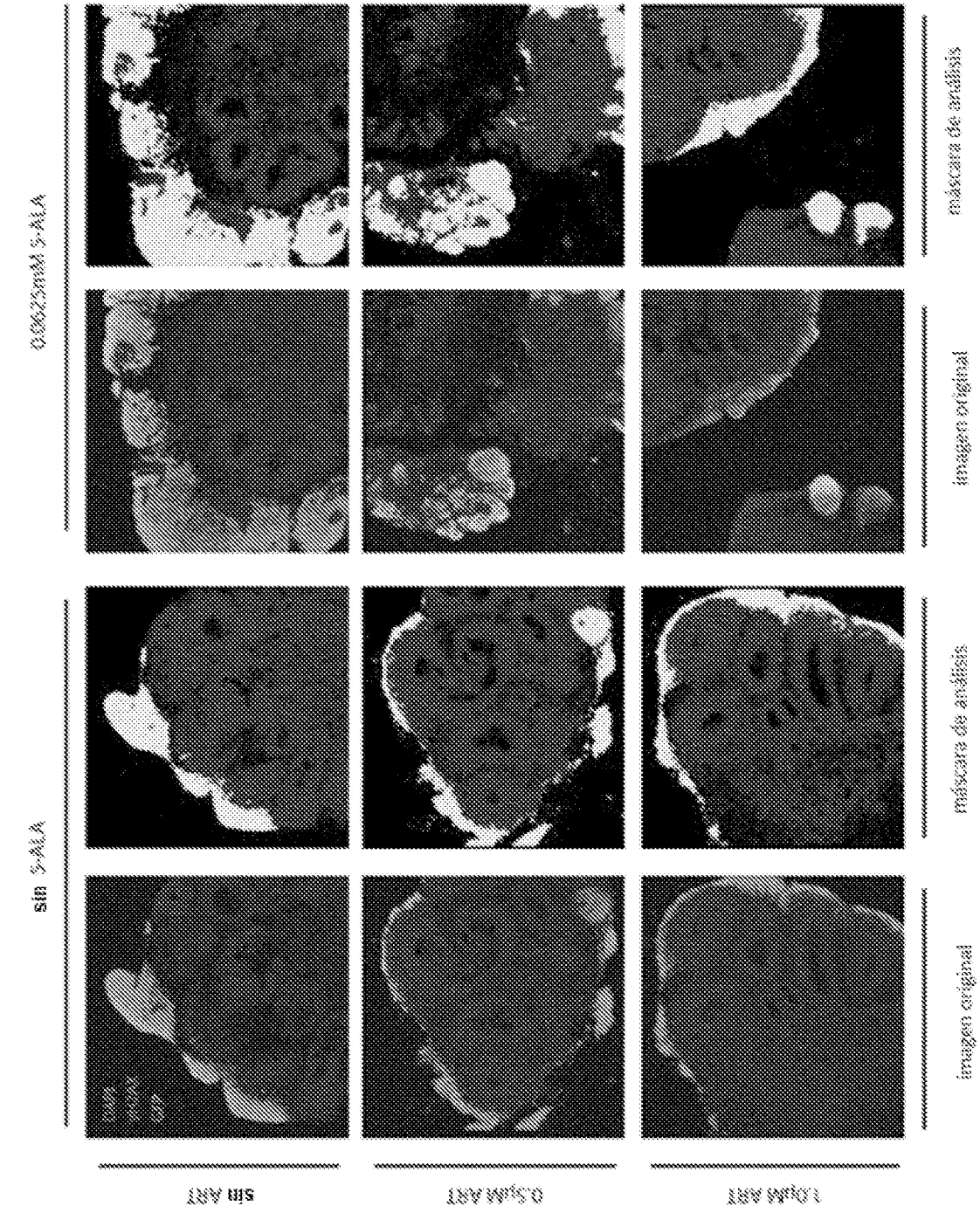


Figura 9 continuación



C

Figura 10

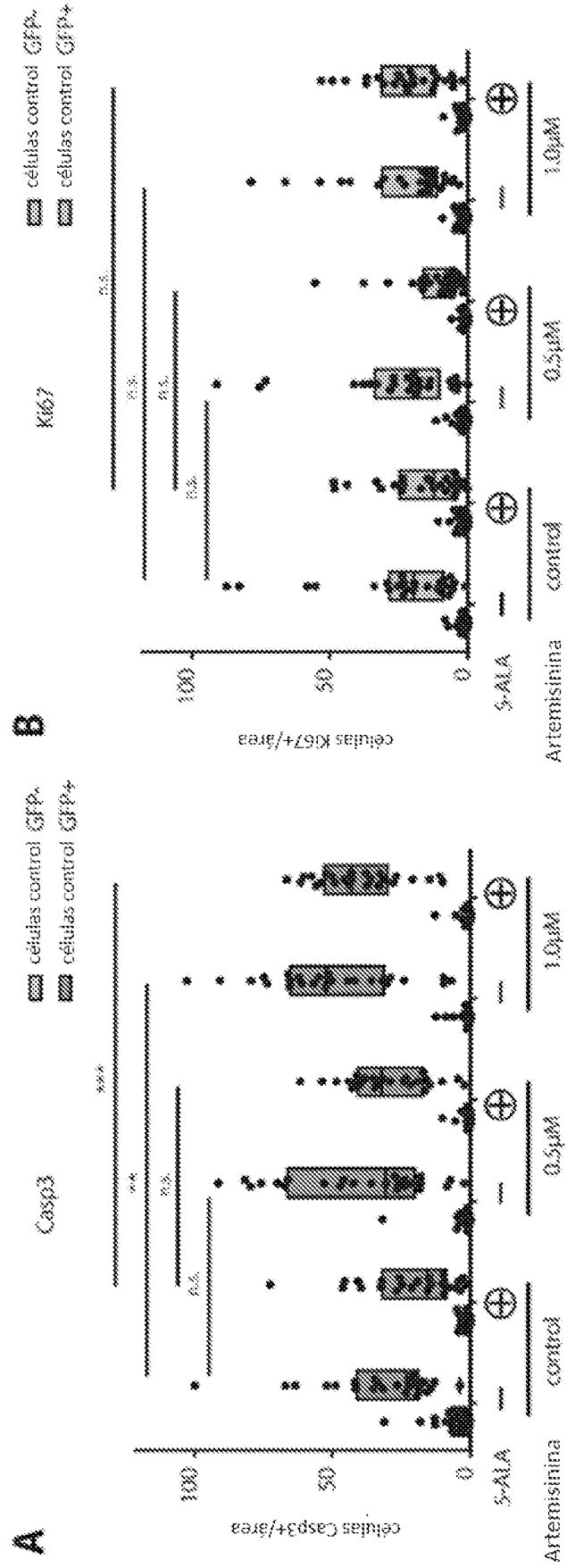


Figura 10 continuación

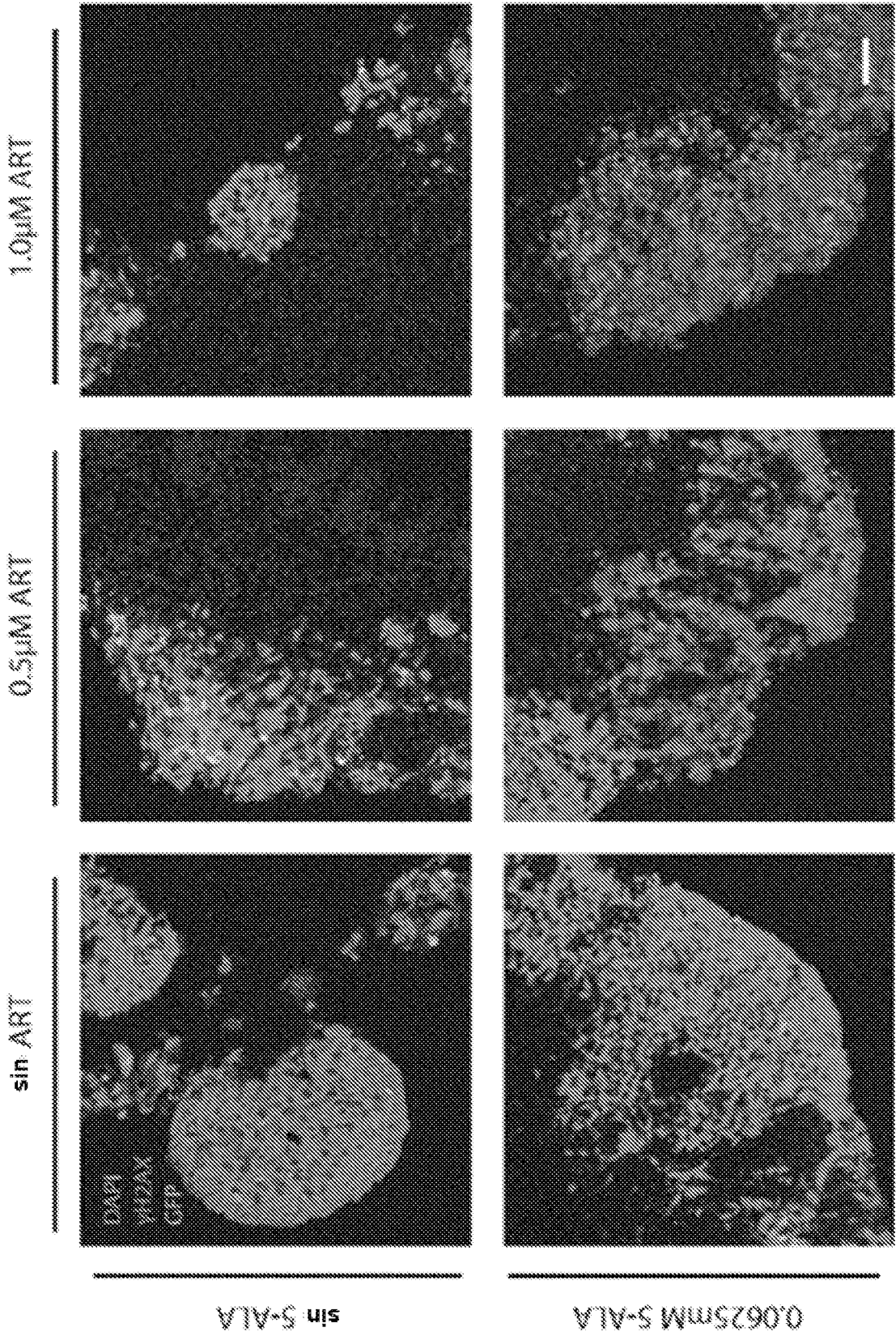


Figura 11

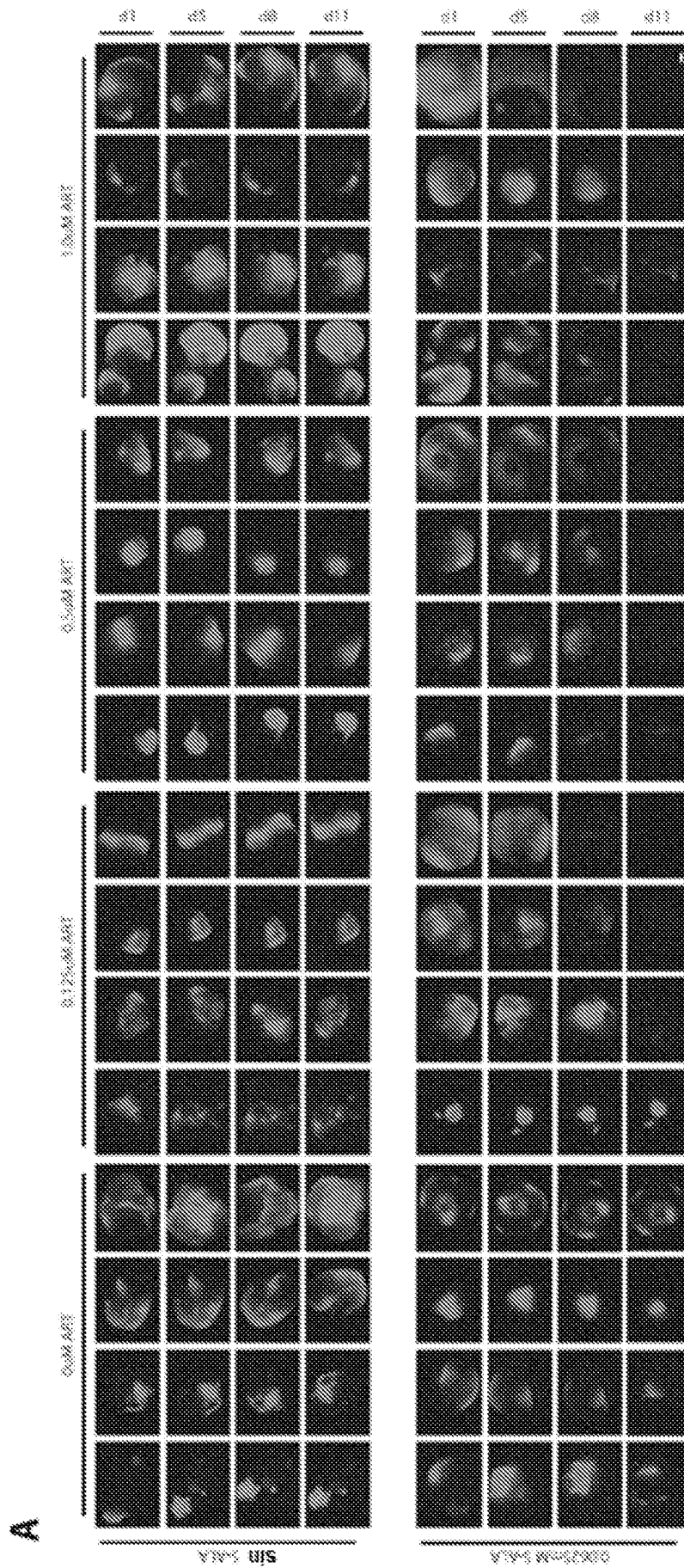


Figura 11 continuación

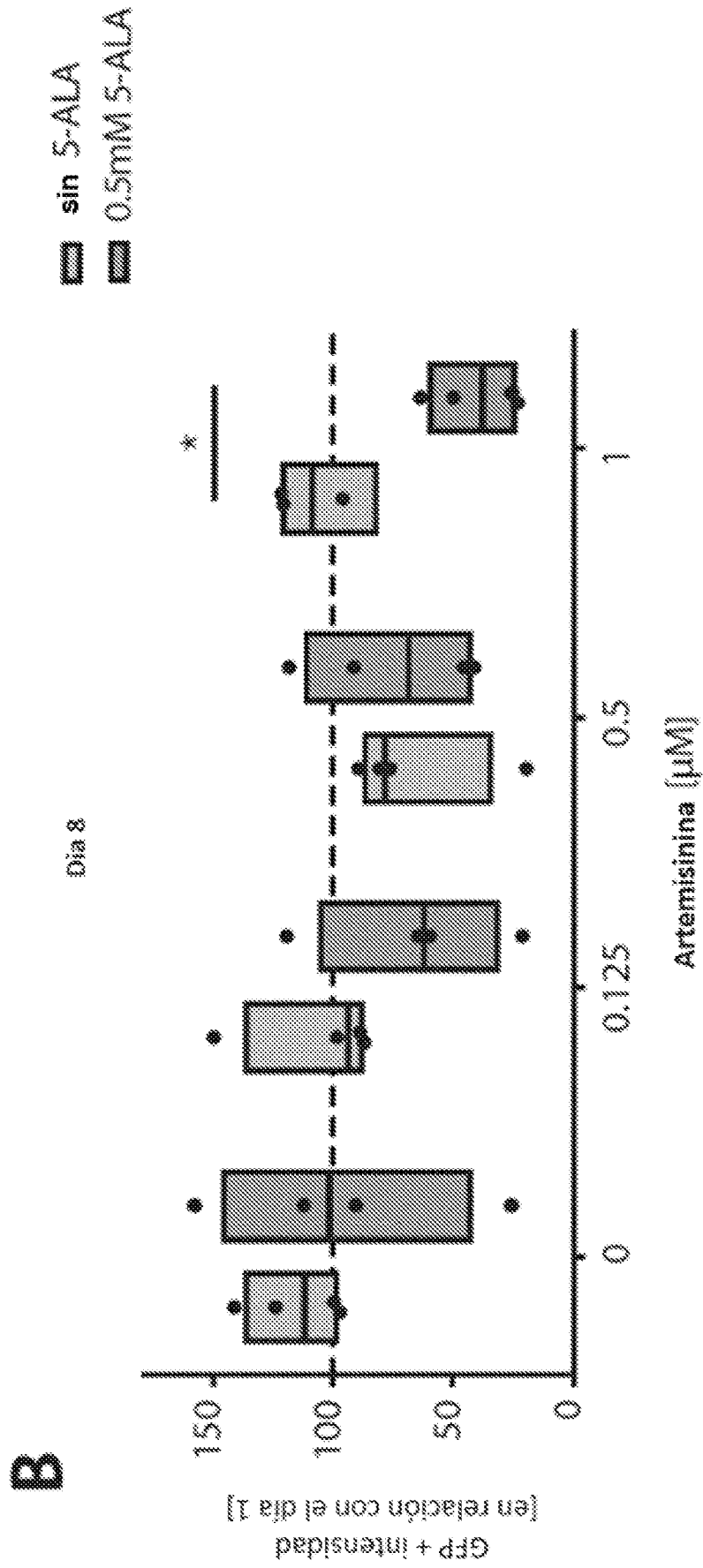


Figura 12

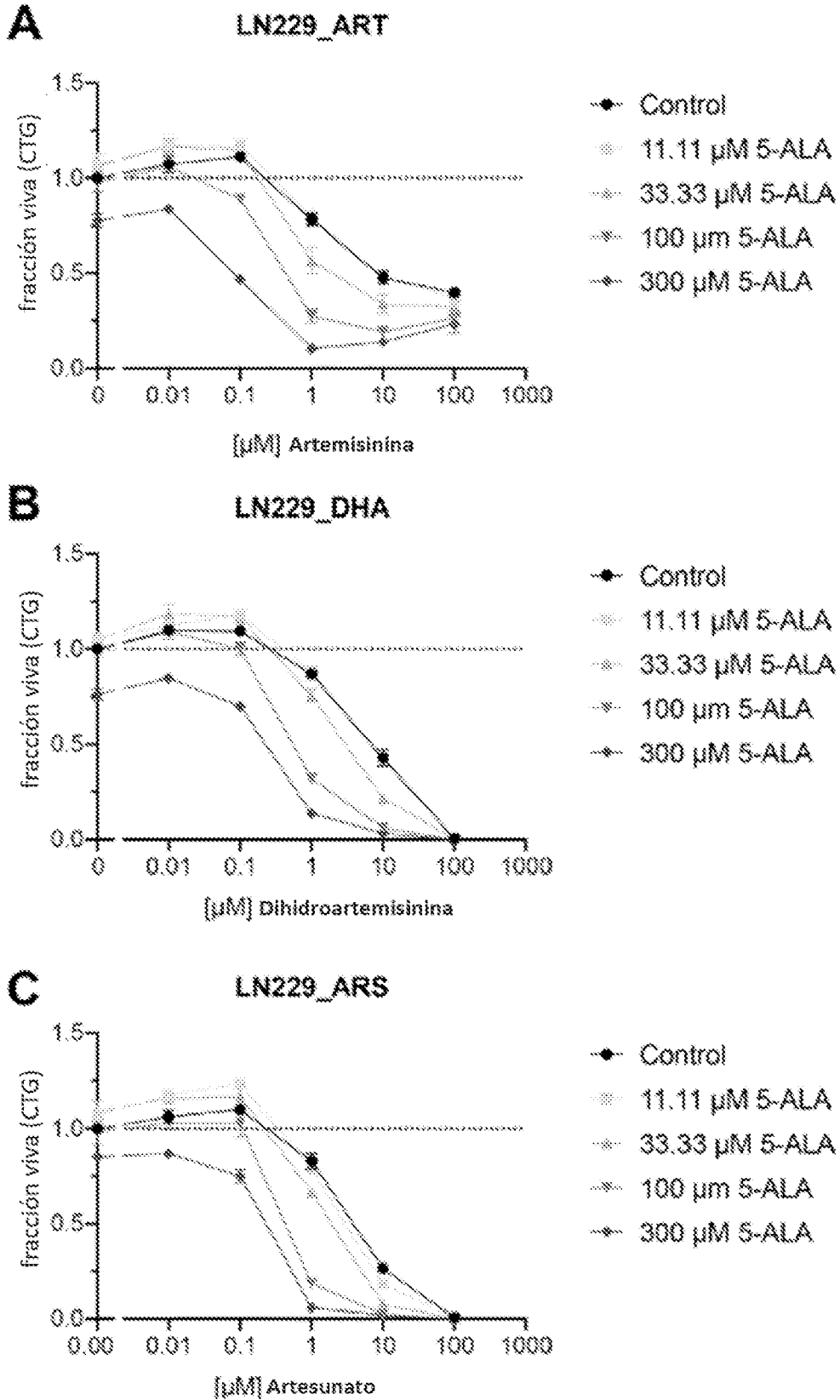


Figura 12 continuación

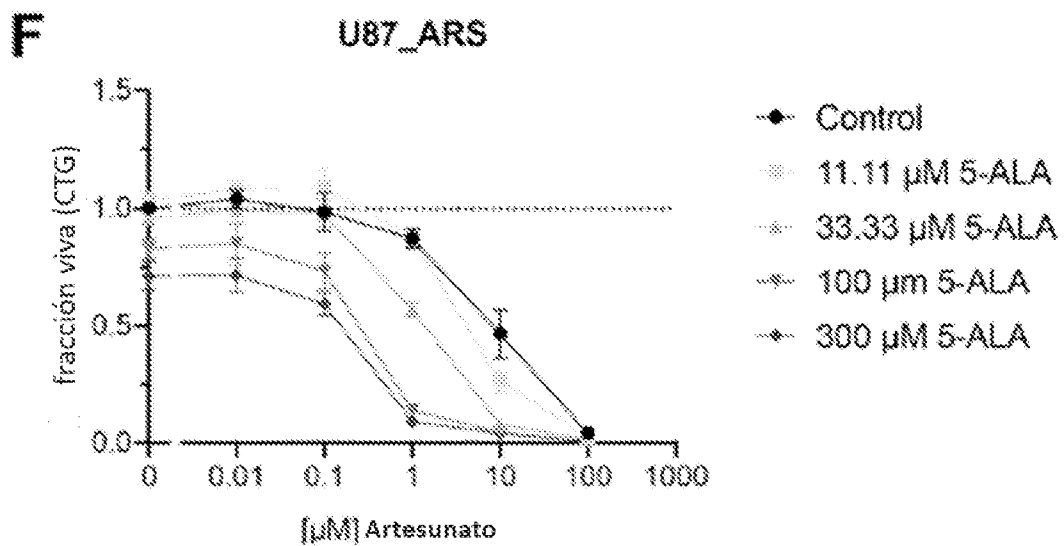
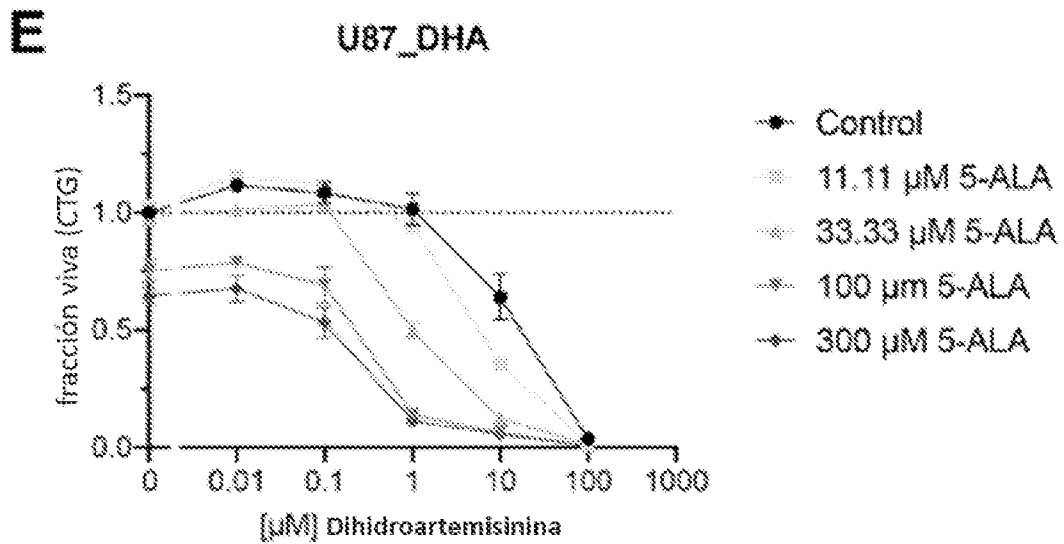
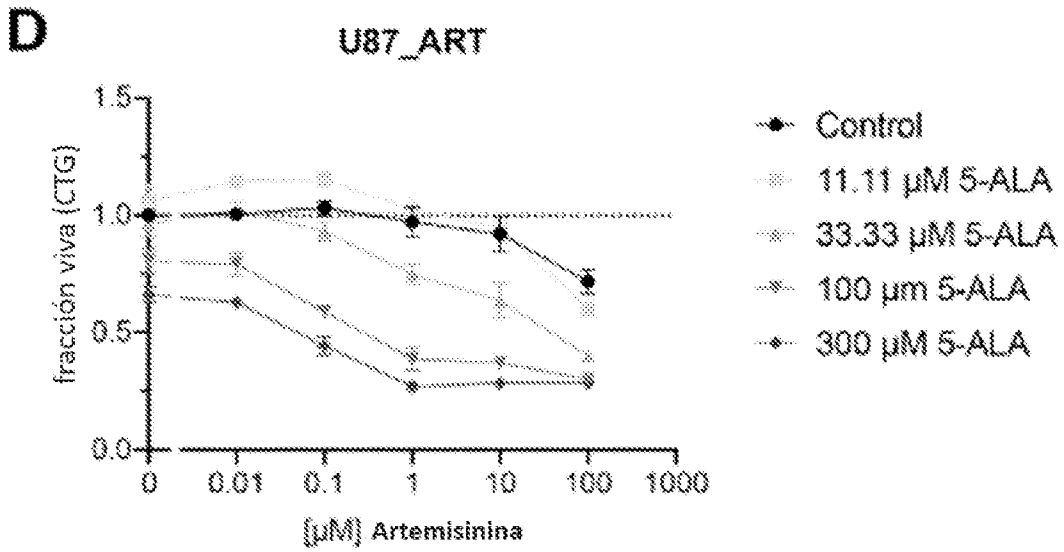


Figura 12 continuación

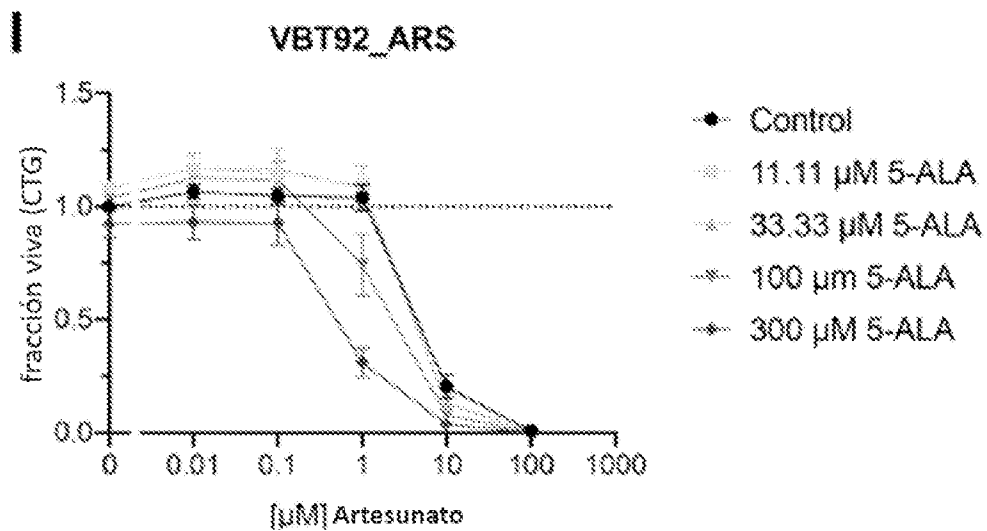
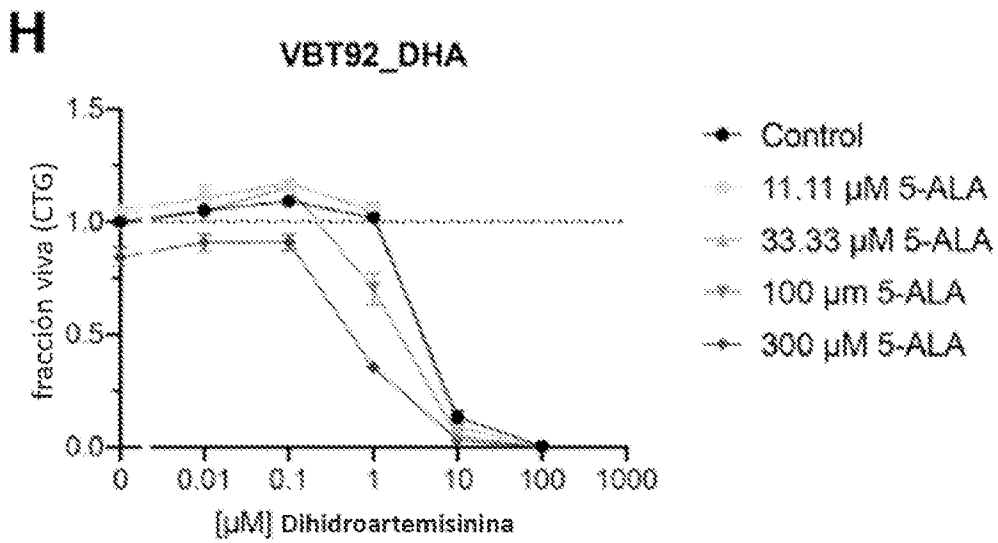
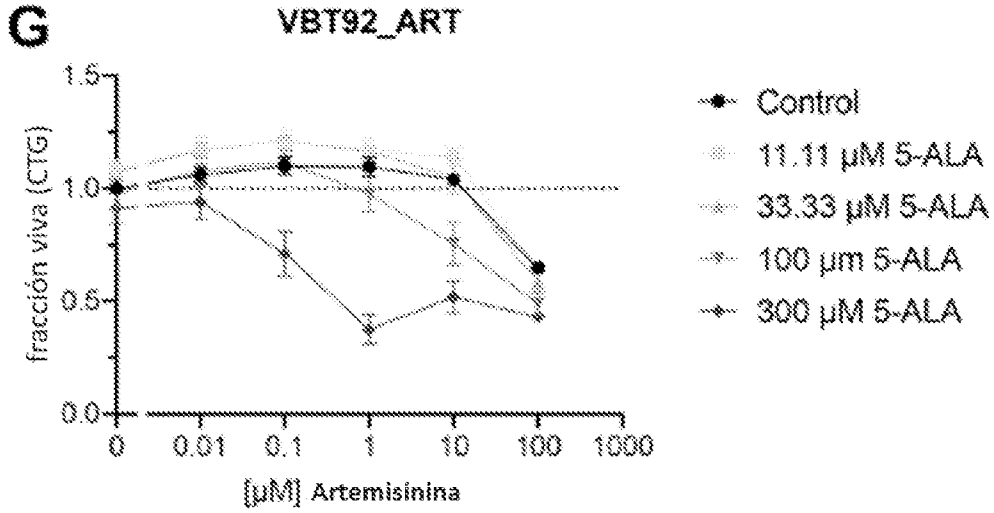


Figura 12 continuación

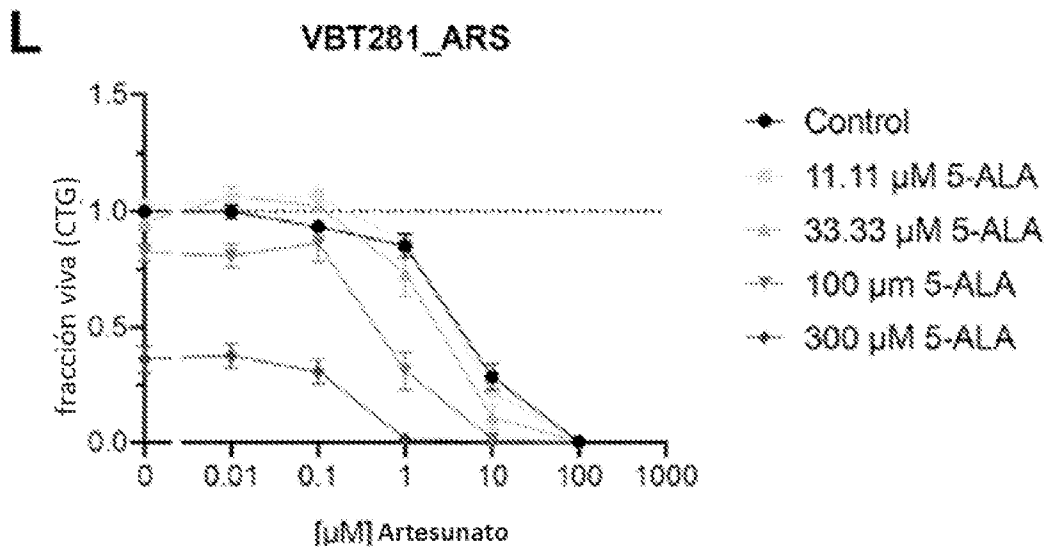
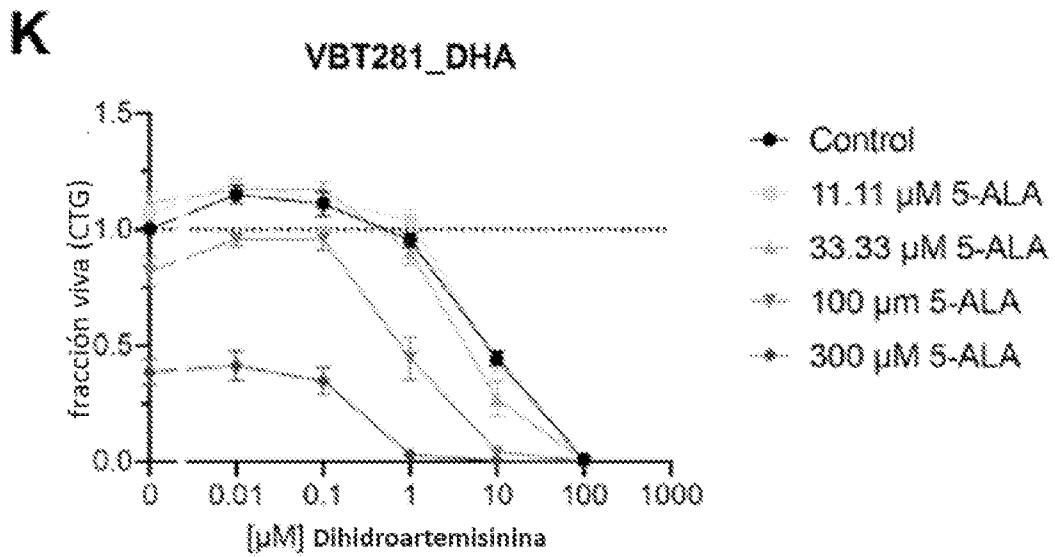
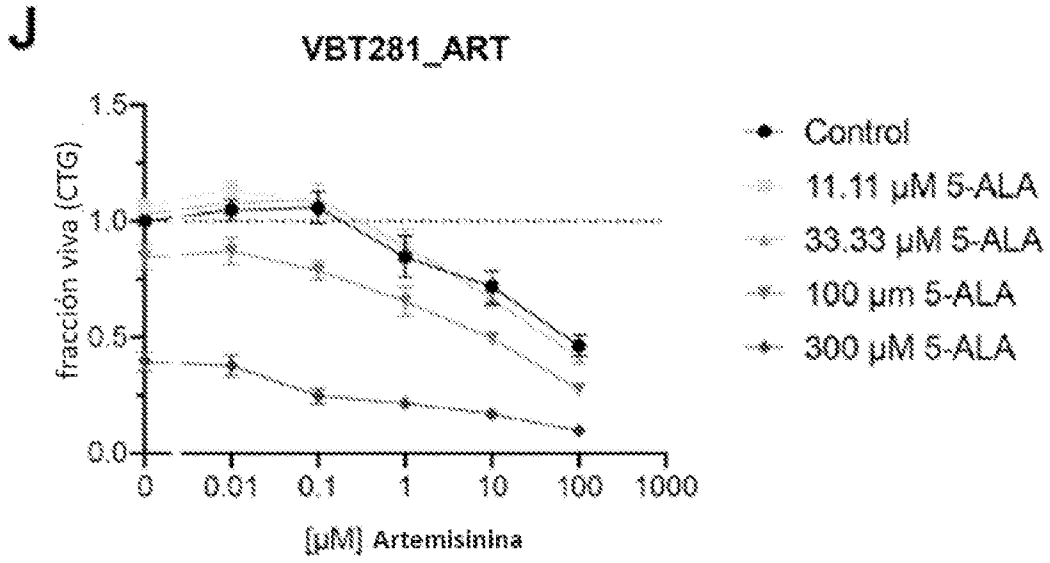


Figura 12 continuación

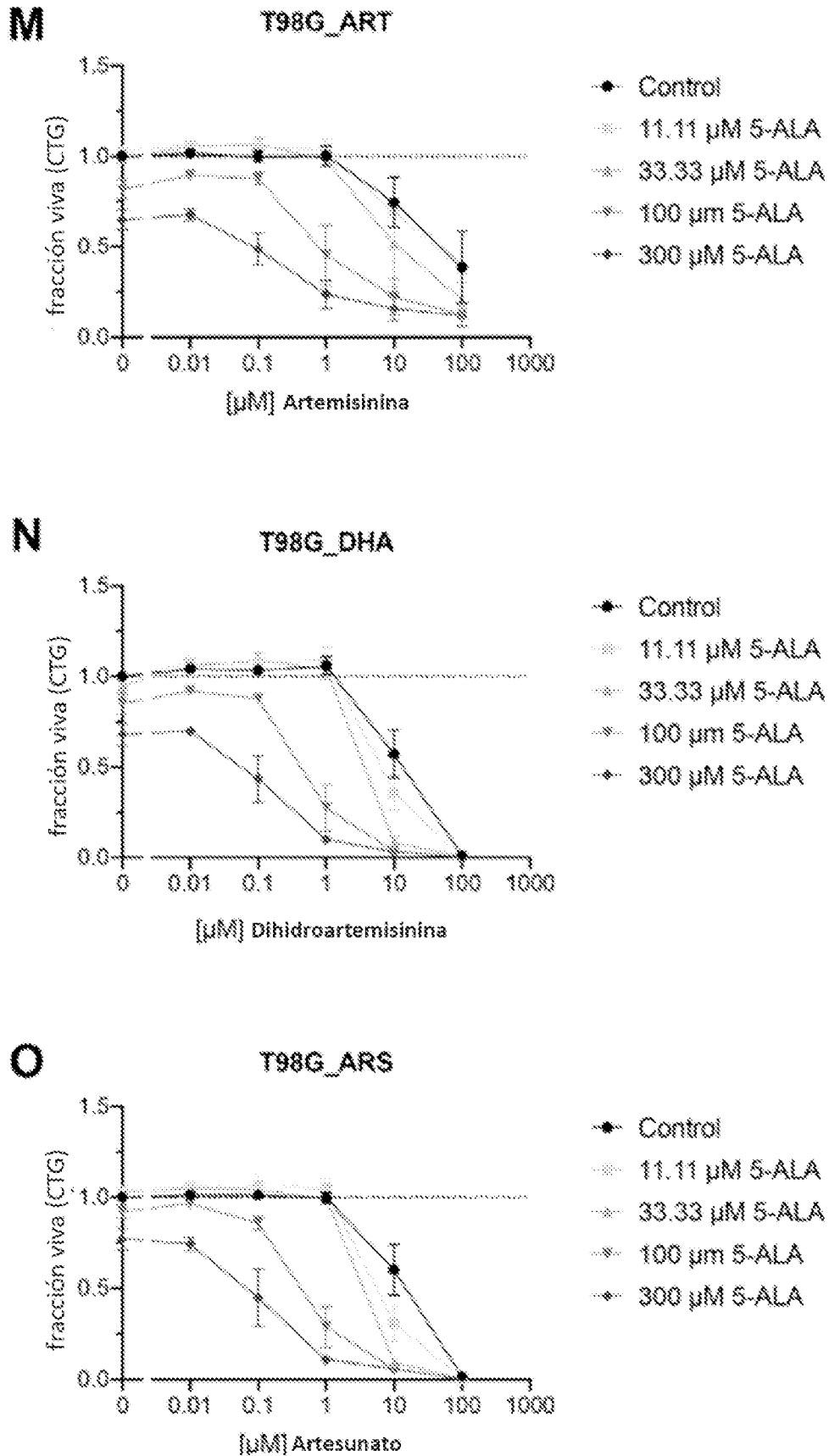


Figura 12 continuación

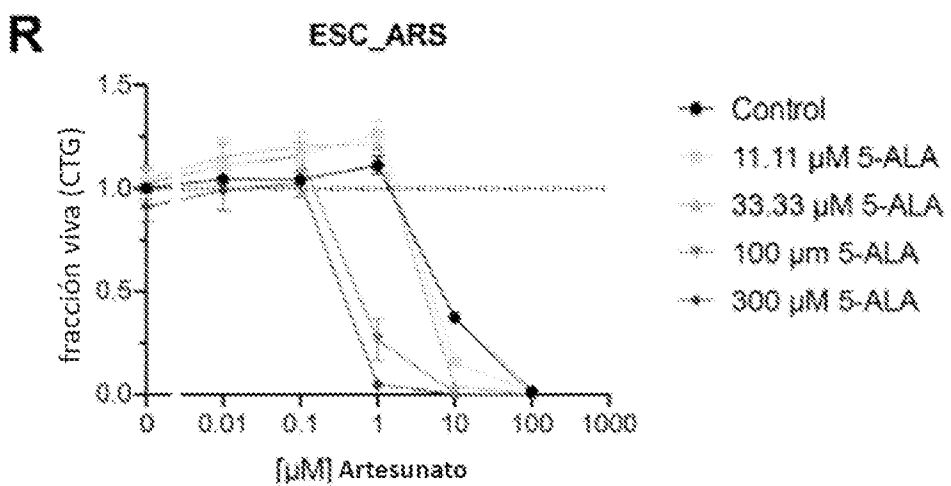
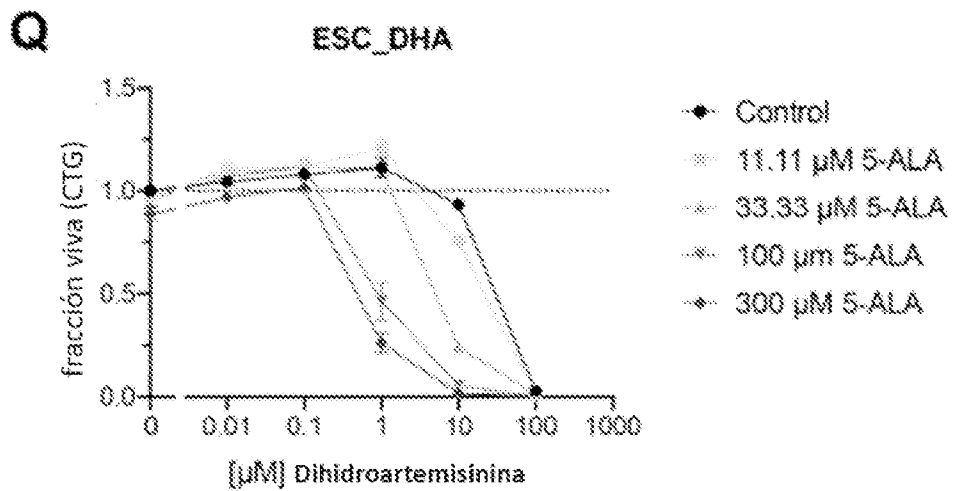
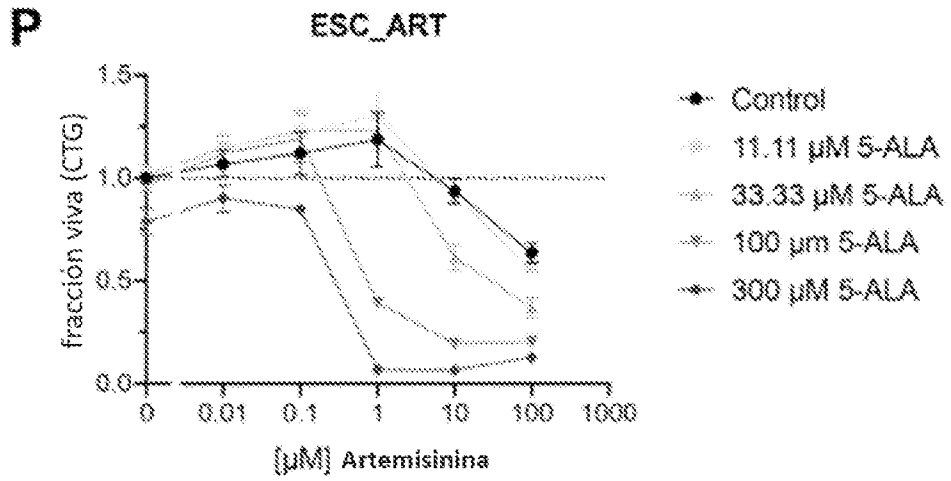


Figura 13

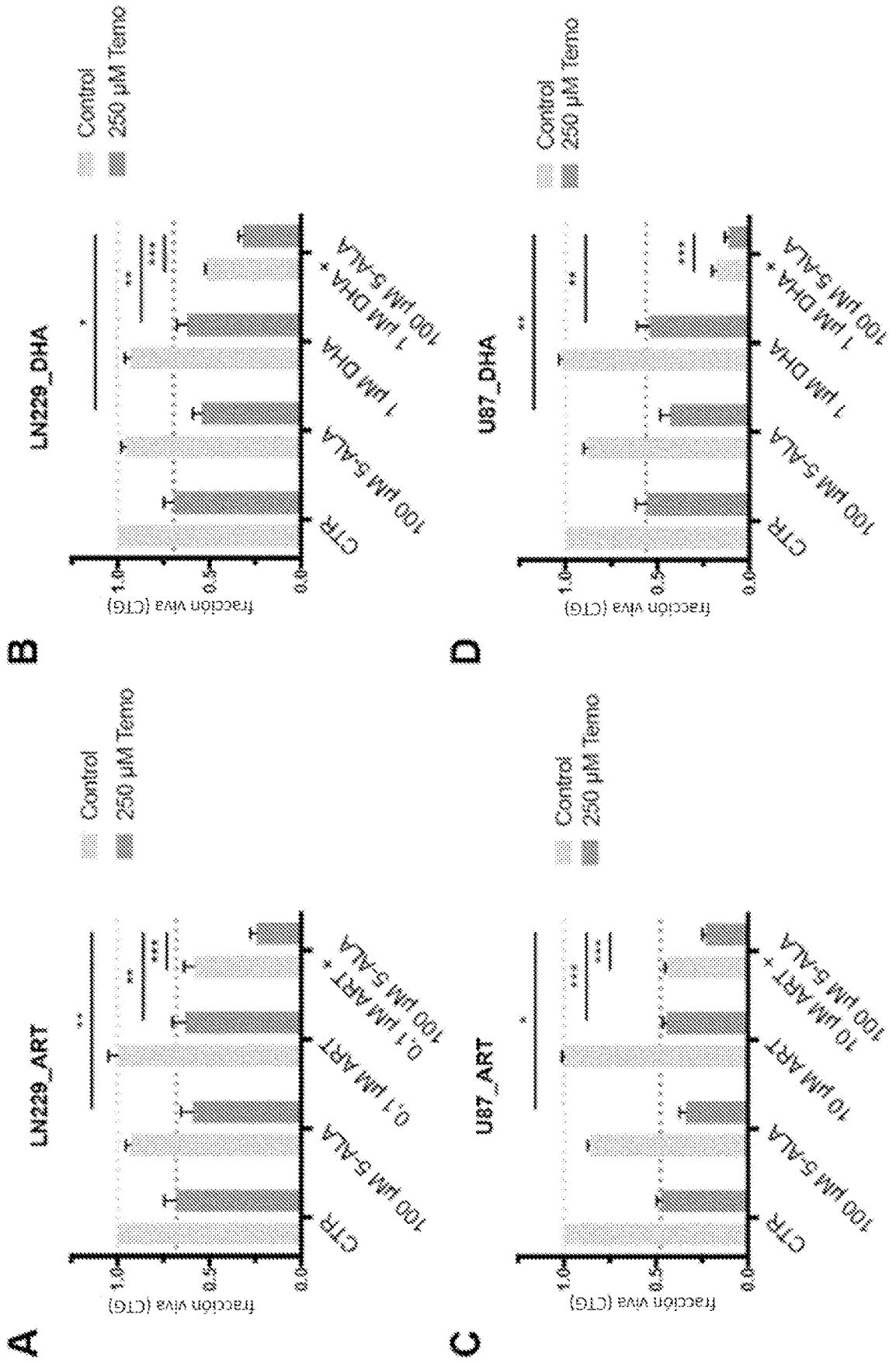


Figura 13 (continuación)

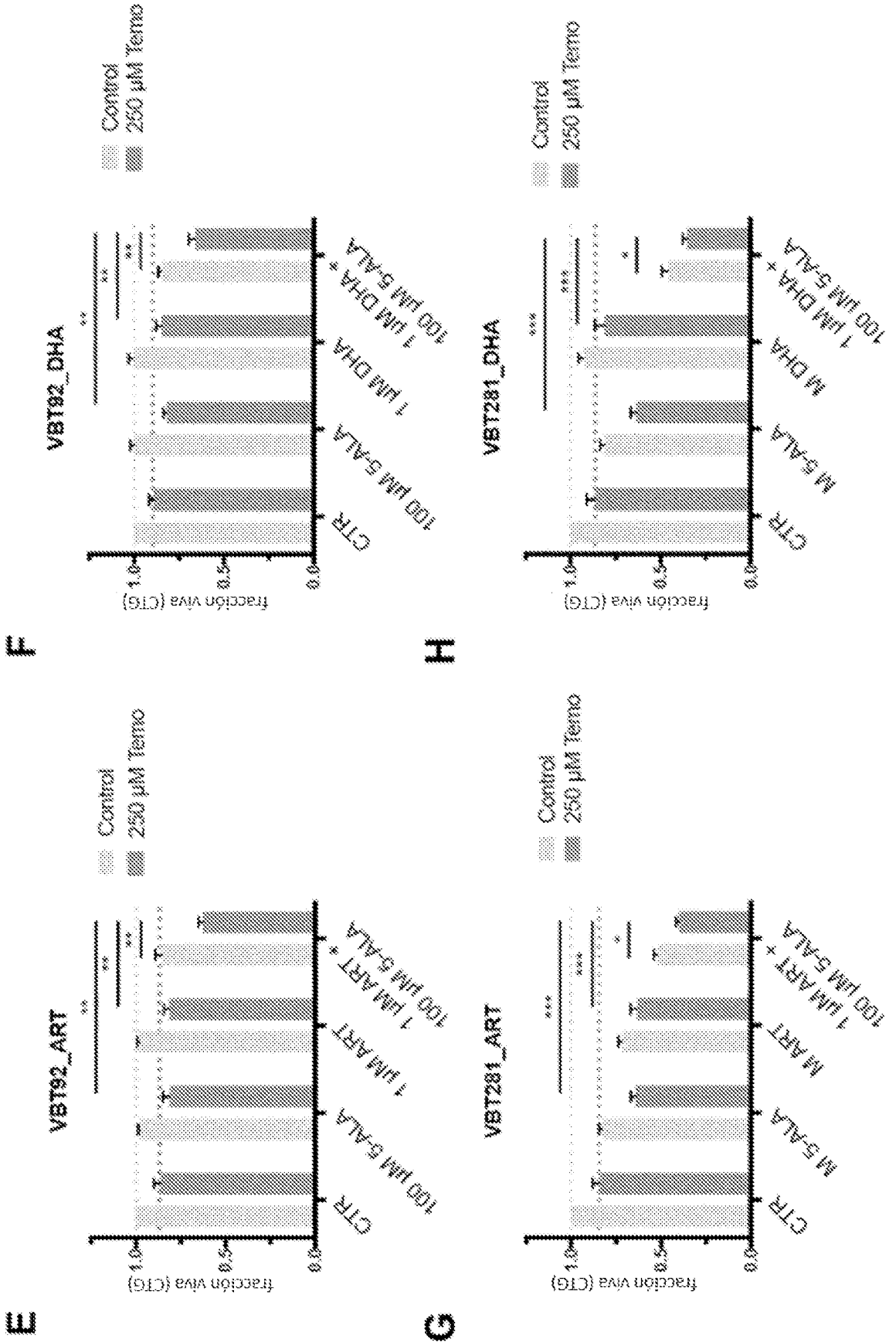


Figura 13 (continuación)

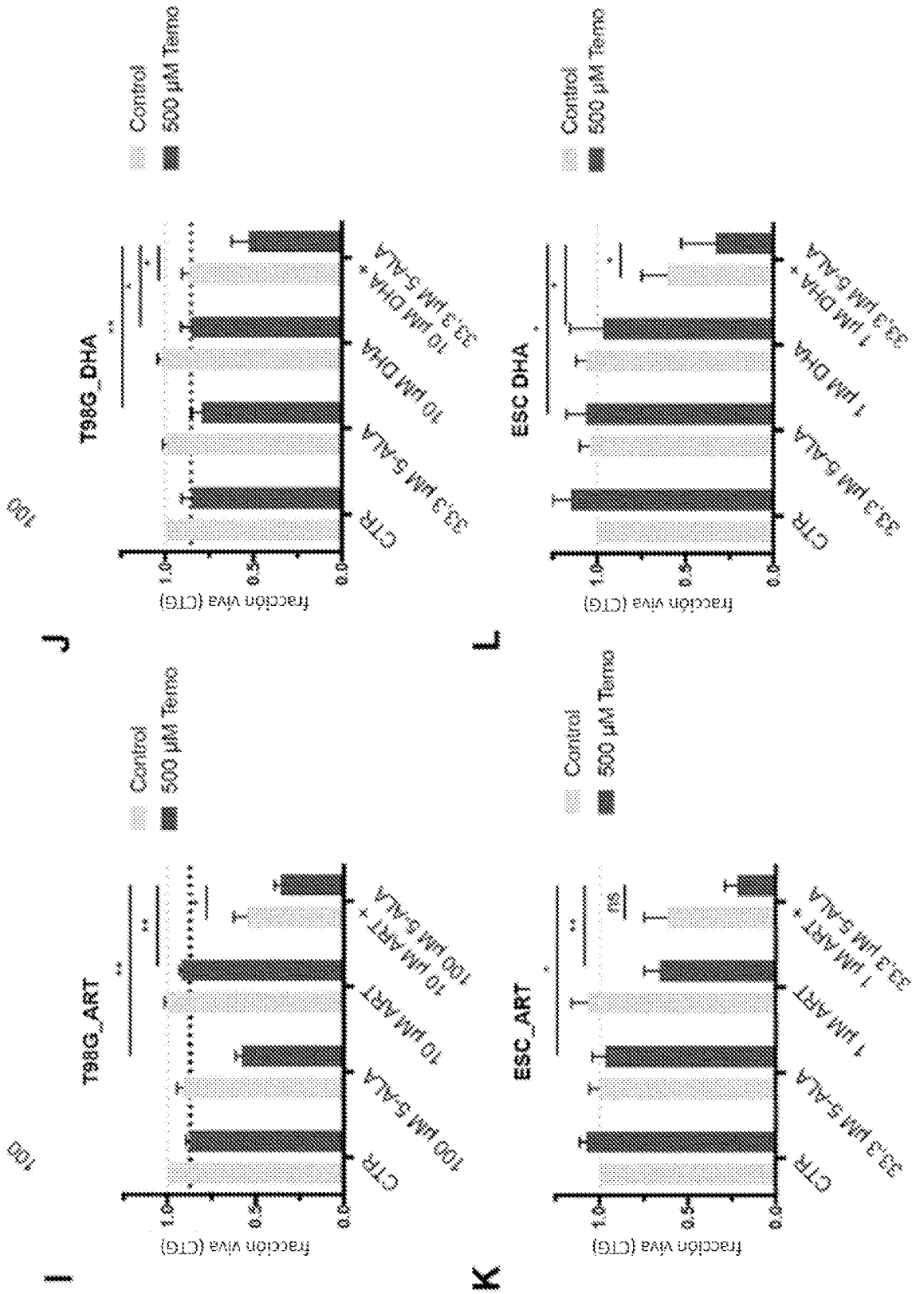


Figura 14

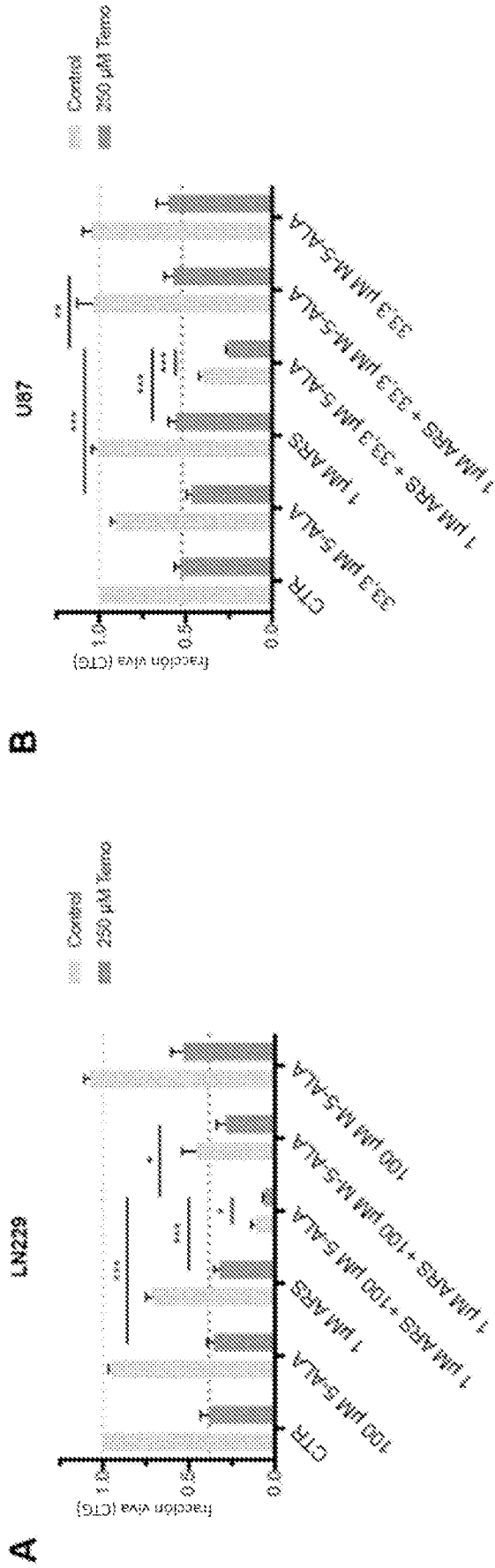


Figura 14 (continuación)

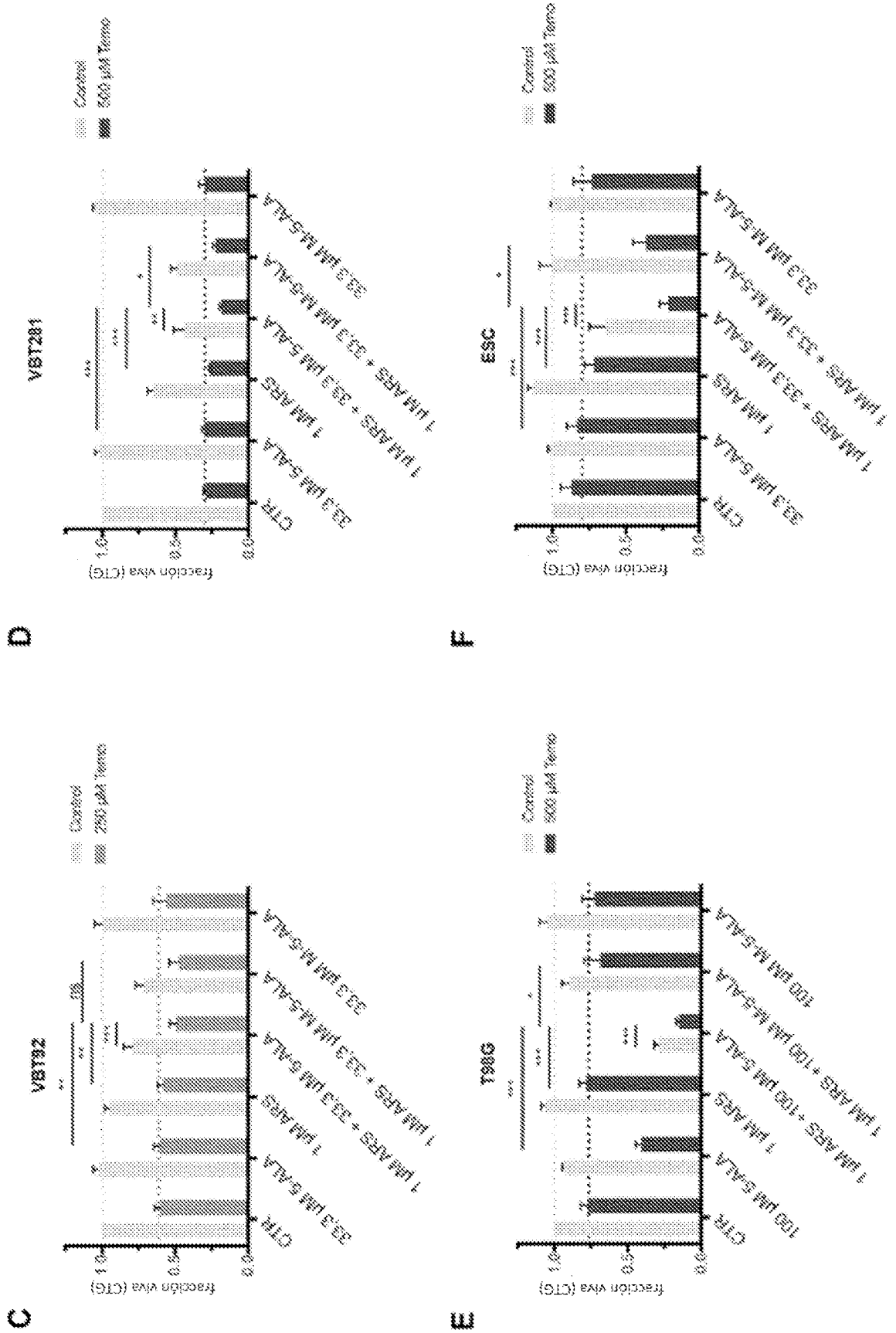


Figura 15

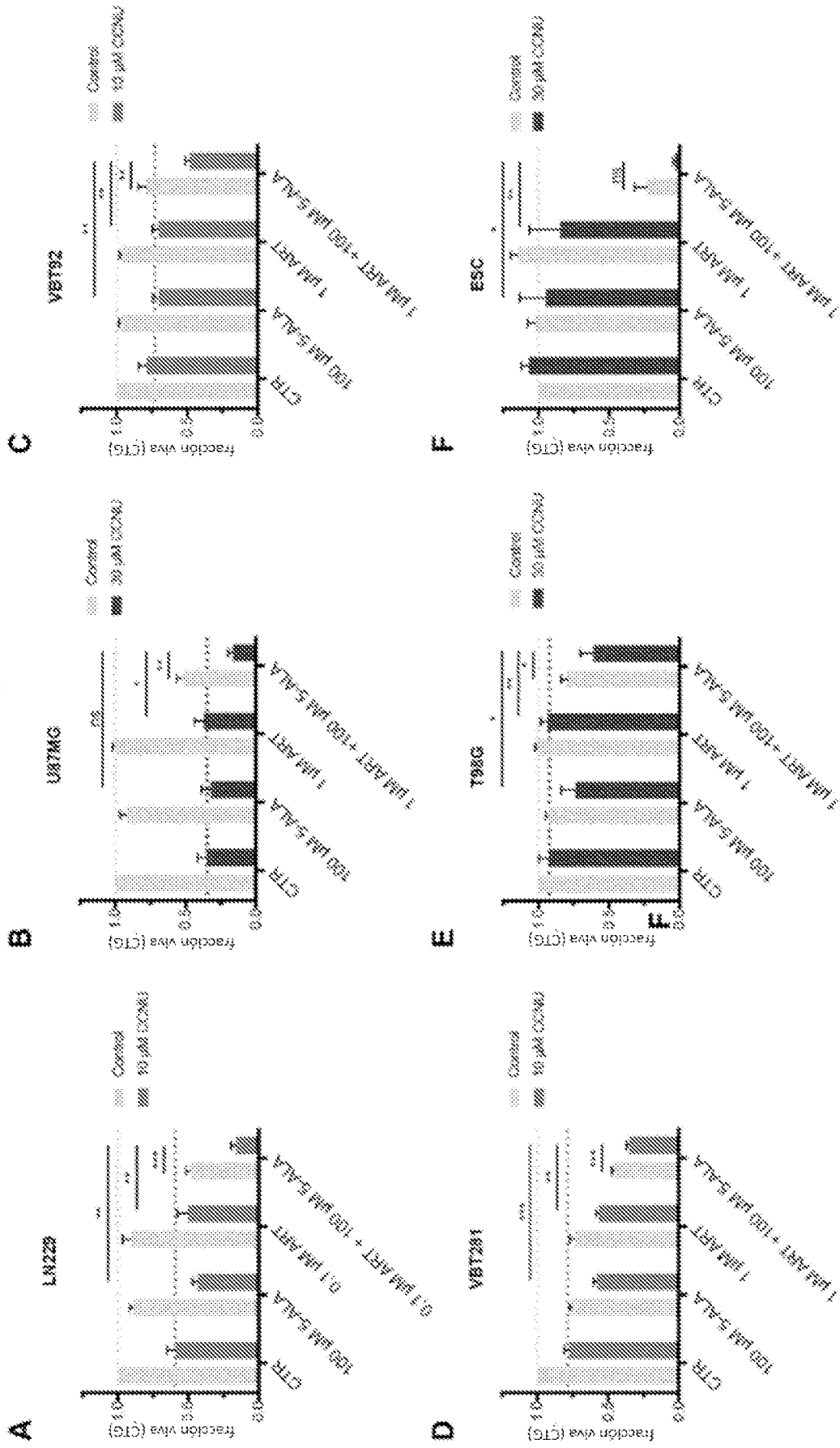


Figura 16

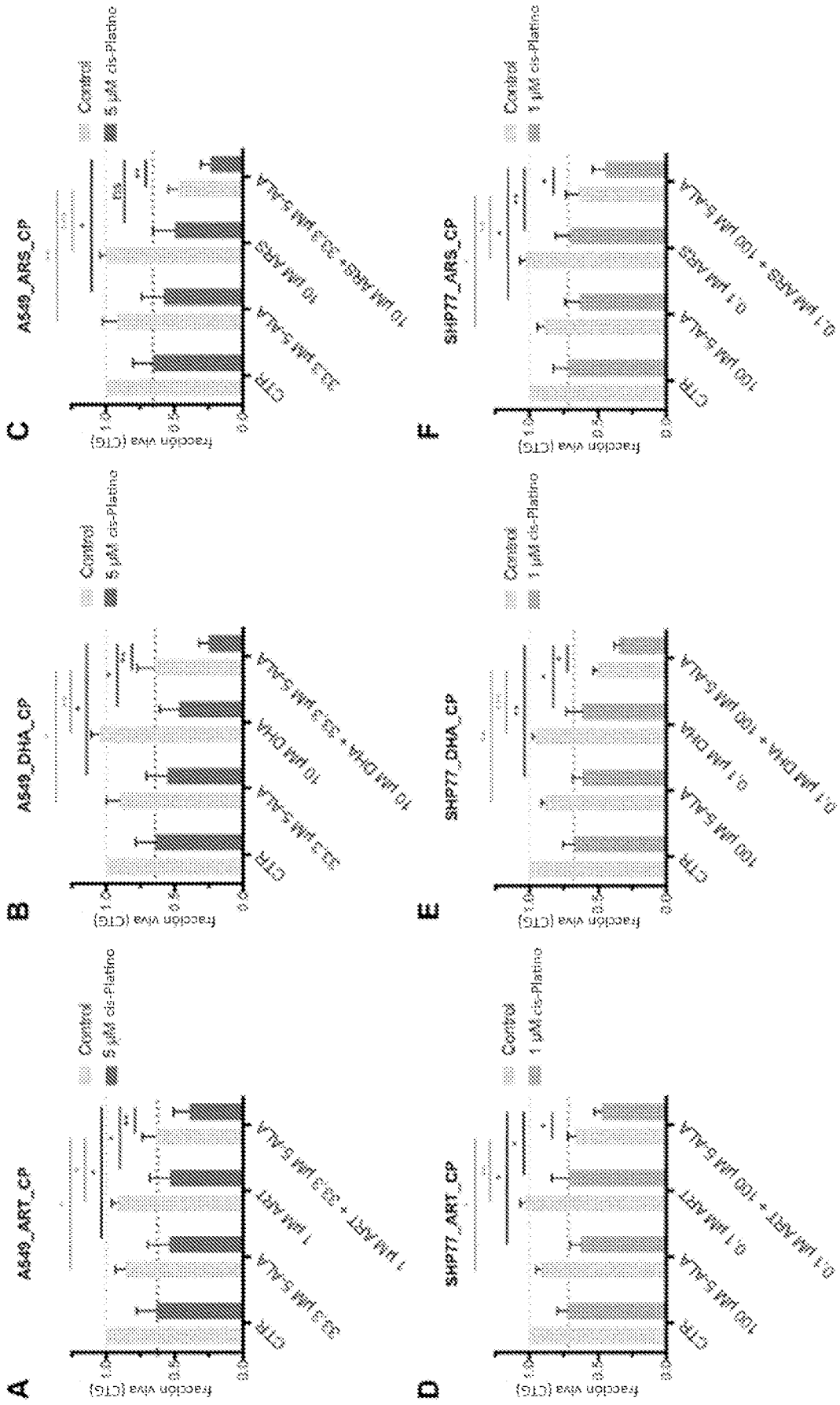


Figura 16 continuación

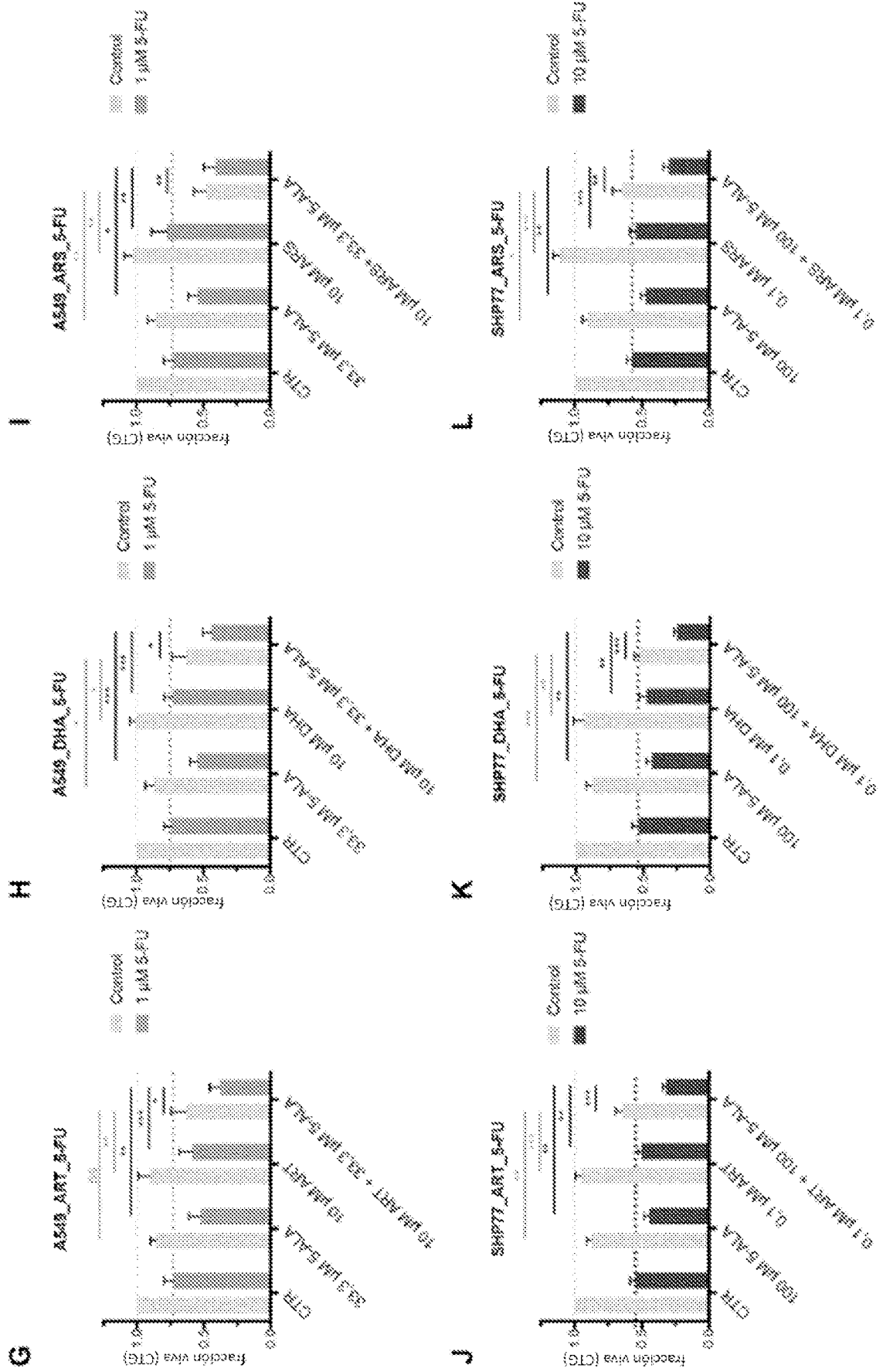


Figure 17

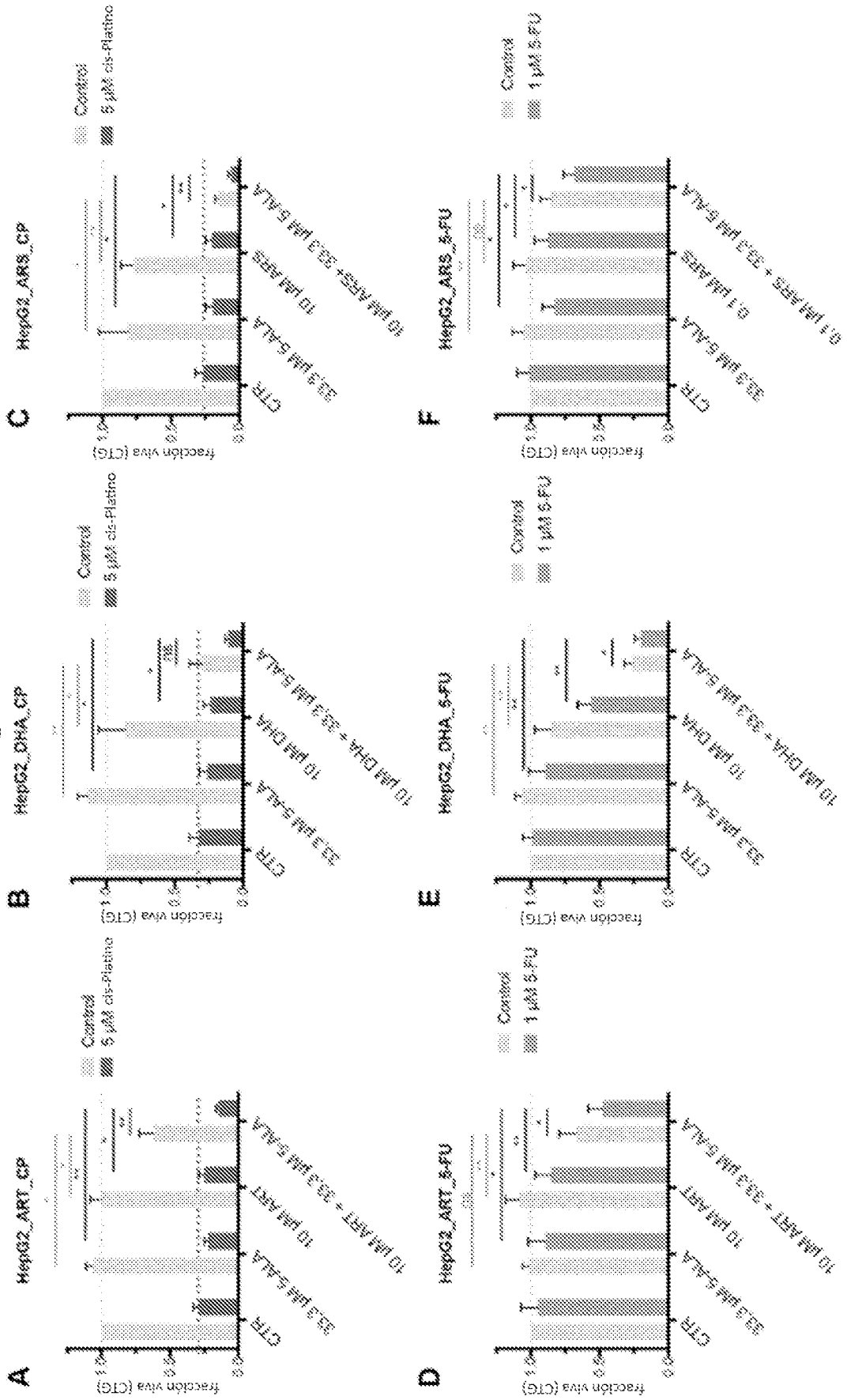


Figura 18

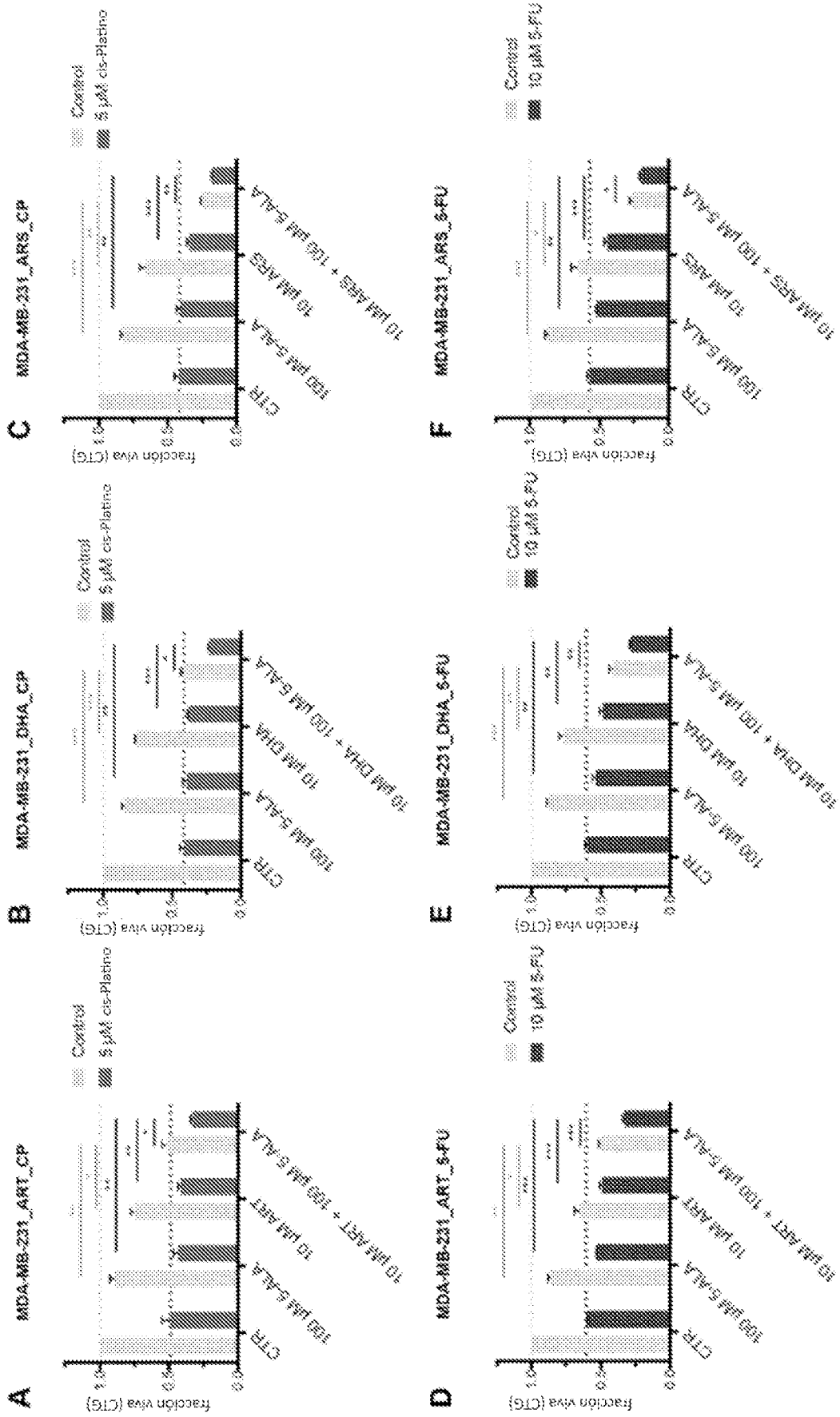


Figura 19

