

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 408**

21 Número de solicitud: 201730598

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4045** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**31.03.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.10.2018**

Fecha de concesión:

**02.07.2019**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**09.07.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N  
18071 GRANADA (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**ESCAMES ROSA, Germanine;  
ACUÑA CASTROVIEJO, Dario;  
GUERRA-LIBRERO RITE, Ana;  
FERNÁNDEZ GIL, Beatriz Irene y  
FLORIDO RUIZ, Javier**

54 Título: **USO DE MELATONINA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES**

57 Resumen:

Uso de melatonina para el tratamiento de tumores. La presente invención describe el uso de melatonina para la preparación de una composición farmacéutica apta para su administración intratumoral para el tratamiento de tumores. Esta composición comprende unas concentraciones elevadas de melatonina, derivados de melatonina o metabolitos, de forma que la melatonina ejerce un efecto oxidante, aumentando la producción de radicales libres y produciendo una activación de la muerte celular.

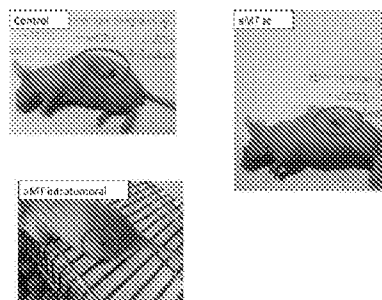


Figura 3

ES 2 684 408 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

**DESCRIPCIÓN**

**USO DE MELATONINA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES**

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

5

La presente invención se encuadra en general en el campo médico y farmacéutico. En particular la presente invención describe el uso de melatonina para el tratamiento de tumores mediante administración intratumoral.

10

**ESTADO DE LA TECNICA**

Tratamiento actual del cáncer

15

La resistencia a los fármacos es una de las principales limitaciones en la oncología clínica y la causa de la recaída en muchos pacientes, por lo que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas se hace fundamental, así como la búsqueda de fármacos que potencien los efectos citotóxicos de los tratamientos habituales, sin potenciar los efectos adversos.

20

El tratamiento actual del cáncer se basa en la aplicación de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia, de manera aislada o concomitante. Los tratamientos primarios son radioterapia, cirugía, o una combinación de ambas; la quimioterapia se usa a menudo como tratamiento adicional o coadyuvante.

25

Por ejemplo, el cáncer de cabeza y cuello, denominado como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), es uno de los seis cánceres más comunes, y representa una incidencia de unos 650000 casos nuevos diagnosticados aproximadamente, y una mortalidad de alrededor de 350000 personas al año en todo el mundo. Los cánceres que se conocen en conjunto como cánceres de cabeza y cuello comienzan generalmente en las células escamosas que revisten las superficies húmedas y mucosas del interior de la cabeza y cuello (National Cancer Institute, Head and Neck Cancers). En España, la incidencia del cáncer de cabeza y cuello para el año 2015 fue estimada en un 16,298%. Se estima que afecta a un 14,483% de hombres y a un 1,815% de mujeres, mientras que para el año 2017 se estima que en mujeres aumente su incidencia.

30

35

Los tres principales tipos de tratamientos para manejar el cáncer de cabeza y cuello son la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia. Los tratamientos primarios son radioterapia, cirugía, o una combinación de ambas; la quimioterapia se usa a menudo como

tratamiento adicional o coadyuvante. Se utiliza cisplatino, y cetuximab en los casos más resistentes. La combinación óptima de las tres modalidades de tratamiento para un paciente con cáncer de cabeza y cuello depende del sitio y del estadio (etapa) de la enfermedad. Existen algunos tratamientos nuevos, así como nuevas combinaciones de 5 tratamientos antiguos. Un buen ejemplo de lo último es el uso en años recientes de una combinación de radio y quimioterapia o inmunoterapia para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello avanzado. Sin embargo, estos tratamientos presentan un alto grado de toxicidad en las células sanas. El tratamiento con quimio y radioterapia se asocia a efectos secundarios a corto y a largo plazo. La mucositis, epitelitis, desnutrición, 10 traqueítis y edema de aritenoides, xerostomía, ageusia, nefrotoxicidad, vómitos y mielosupresión son los efectos agudos más importantes del tratamiento en los pacientes con tumores de cabeza y cuello. También aparecen una serie de efectos tardíos como xerostomía, hipogeusia, hipotiroidismo, alteraciones dentales, trismus, necrosis ósea o cartilaginosa, mielitis cervical, hipoacusia, cataratas y retinopatía. De todos los efectos 15 agudos del tratamiento contra el cáncer, la mucositis es el más frecuente e importante, constituyendo la principal causa de la interrupción del tratamiento.

Aunque el pronóstico depende de múltiples factores, se puede generalizar que la tasa de supervivencia a 1 año es del 75% y del 42% a los 5 años. Entre sus características generales están la ausencia de un diagnóstico temprano, muchos de ellos se presentan 20 en fases avanzadas y con síntomas parecidos a enfermedades comunes que pueden retrasar el diagnóstico definitivo. Ausencia de un *screening* eficaz, la tendencia a la recaída local más que a dar metástasis a distancia, y el poder afectar a una o varias funciones importantes e incluso vitales como son la deglución, la respiración y el habla. Desafortunadamente hasta el 75% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello se 25 diagnostican con enfermedad localmente avanzada. En estos estadios más avanzados, se han integrado estrategias más recientes al tratamiento local, tales como la quimioterapia de inducción y/o quimiorradioterapia; sin embargo, la tasa de supervivencia a 5 años continúa siendo de alrededor del 30%, y el 60% de los pacientes experimentarán una recaída locorregional o a distancia en los 2 años siguientes al 30 tratamiento inicial. Además hay situaciones muy desfavorables, como son los pacientes con cáncer de cabeza y cuello recidivado o metastásico. El tratamiento estándar de cáncer de cabeza y cuello recidivado o metastásico es la quimioterapia con platino o cetuximab, generalmente con dobletes, que obtienen respecto a la monoterapia una mayor tasa de respuesta, alrededor de 30%, pero no de supervivencia 6 a 8 meses. 35 Tras el fracaso de este tratamiento nos encontraríamos en una situación todavía más desalentadora. En consecuencia, se esperan con urgencia nuevos tratamientos que

sean más eficaces y que puedan proporcionar un mejor perfil de seguridad en cáncer de cabeza y cuello. Esta es la razón del desarrollo de nuevos fármacos o combinaciones de fármacos en la enfermedad avanzada refractaria.

- 5 En resumen, el problema de la terapia anti-tumoral al día de hoy es la resistencia que desarrollan los tumores. Por esta razón es necesario disponer de agentes terapéuticos con un perfil de toxicidad aceptable.

10 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona endógena sintetizada a partir de triptófano y producida por la glándula pineal. Hoy día sabemos que la melatonina también se produce en múltiples tejidos y órganos a concentraciones mucho más altas que la producida en la glándula pineal [Acuña-Castroviejo *et al.* Cell Mol Life Sci 2014, 71, 2997-3025].

15

La melatonina es un potente antioxidante que, además de depurar radicales libres, aumenta la expresión y la actividad de los enzimas antioxidantes endógenos tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRd) y  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintasa. Además, conforme elimina los radicales libres, la melatonina genera una serie de metabolitos que también son depuradores de radicales libres tan potentes como la propia melatonina (Urata, Y *et al.* Free Radic Biol Med 1999, 27, 838-847). En otras palabras, la melatonina es más eficaz que otros antioxidantes para prevenir el daño causado por el estrés oxidativo.

20

Además, debido a sus propiedades físico-químicas, atraviesa todas las membranas alcanzando todos los compartimentos celulares, inclusive la mitocondria donde es capaz de mantener la homeostasia mitocondrial en diferentes modelos experimentales (Acuña-Castroviejo *et al.* Cell Mol Life Sci 2014, 71, 2997-3025; Diaz-Casado *et al.* J Pineal Res 2016, 61, 96-107; Doerrier *et al.* Mitochondrion 2016, 27, 56-63). La melatonina aumenta la fluidez de la membrana, la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC), la producción de ATP y el potencial de la membrana mitocondrial, mientras que reduce el estrés oxidativo y el cierre de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial.

25

30

Por otro lado, la melatonina tiene importantes efectos antiinflamatorios que incluyen la inhibición de la expresión de la iNOS / i-mtNOS, COX-2 y de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ . Muchas de estas propiedades se atribuyen a la inhibición de

35

la vía NF- $\kappa$  B-dependiente de la función de la vía inmune innata (Escames *et al.* FASEB J 2003, 17, 932-934; Escames *et al.* Journal of Pineal Research 2006, 40, 71-78).

Recientemente, también se ha demostrado que la melatonina inhibe la vía del inflammasoma NLRP3 en diferentes condiciones experimentales (Ortiz *et al.* J Pineal Res 2015, 58, 34-49; Garcia *et al.* FASEB J 2015, 29, 3863-3875; Volt *et al.* J Pineal Res 2016, 60, 193-205).

También se ha demostrado que un gel de melatonina previene la aparición de mucositis en ratas irradiadas, previene la inflamación y la necrosis duodenal y restaura los niveles de melatonina endógena de la mucosa de los animales irradiados (Ortiz *et al.* J Pineal Res 2015, 58, 34-49). Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico con este gel en pacientes con cáncer de cabeza y cuello para prevenir la mucositis oral.

La melatonina se ha administrado en pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos (Mohan y Brunner, 2005. Acta Anaesthesiol Scand 49:1397). Su utilización por vía intravenosa en recién nacidos con sepsis produce una disminución significativa de la mortalidad sin efectos secundarios (Gitto *et al.*, 2004. J PediatrSurg 39: 184).

También se ha demostrado la utilidad de administración intravenosa en pacientes con sepsis utilizando una composición inyectable de melatonina [WO 2015/144965].

20

#### Tratamiento de Cáncer mediante melatonina

Numerosos trabajos han demostrado que la melatonina contiene notables propiedades oncostáticas. Sus propiedades antiproliferativas han sido demostradas en una amplia variedad de tumores, incluyendo cánceres de mama, endometrio, próstata, colon y ovario, así como coriocarcinoma, melanoma, neuroblastoma y osteosarcoma, entre otros (Lissoni *et al.* Anticancer Res 2000, 20, 2103-2105; Hong *et al.* J Pineal Res 2014, 56, 264-274).. La melatonina inhibe directamente la proliferación y el crecimiento de las células tumorales (Ma *et al.* Oncotarget 2016, 7, 46768-46784). La melatonina protege a las células normales de la apoptosis mientras que, al mismo tiempo, aumenta la muerte celular por apoptosis en varios tipos de células cancerosas (Trubiani *et al.* J Pineal Res 2005, 39, 425-431). Su acción anticancerígena inmunomoduladora también aumenta la respuesta inmune antitumoral (Miller *et al.* Int J Exp Pathol 2006, 87, 81-87). Además, la melatonina tiene un importante efecto metabólico al disminuir la captación de glucosa por las células cancerosas y, en consecuencia, inhibir el crecimiento tumoral a través de la supresión de la absorción de ácido linoléico y su metabolismo por el tumor

35

a la molécula mitogénica 13-HODE (Blask *et al.* Cancer Res 1999, 59, 4693-4701). Las propiedades anti-angiogénicas y anti-metastásicas de la melatonina también han sido demostradas en numerosos estudios (Tischer *et al.* J Biol Chem 1991, 266, 11947-11954; Park *et al.* J Pineal Res 2010, 48, 178-184.; Su *et al.* J Pineal Res 2017, 62).

5 Dada la capacidad que tiene esta molécula para aumentar la eficacia de los fármacos antitumorales, estos datos muestran que la melatonina puede usarse no sólo para tratar la mucositis debido a la ausencia de efectos secundarios adversos, sino que también puede usarse en programas de co-tratamiento del cáncer.

10 A pesar de que existen numerosos trabajos que demuestran los efectos oncostáticos de la melatonina en células tumorales, no hay ningún estudio donde se vea que la melatonina destruye el tumor. Hasta ahora se ha visto en ratones que puede reducir el tamaño del tumor sin que este llegue a desaparecer. Es decir, en animales hay cierto grado de resistencia a la melatonina.

15

La resistencia a los fármacos es una de las principales limitaciones en la oncología clínica y la causa de la recaída en muchos pacientes, por lo que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas se hace fundamental, así como la búsqueda de fármacos que potencien los efectos citotóxicos de los tratamientos habituales, sin potenciar los efectos adversos.

20

Existen muchos ejemplos de fármacos que muestran un comportamiento citotóxico en células tumorales *in vitro*, y que pierden su eficacia *in vivo* o cuando se llevan a la clínica. En muchos casos, esta quimiorresistencia es debida al microambiente del tumor.

25 Técnicas de inyección intralesional

También están descritas en el estado de la técnica numerosos tratamientos de cáncer mediante técnicas de inyección intralesional, mediante la inyección intratumoral de etanol, ácido acético, suero caliente o quimioterápicos.

En particular, la inyección intratumoral de etanol es una técnica sencilla y económica empleada en el tratamiento de hepatocarcinomas especialmente encapsulados.

30

Composiciones intratumorales que comprenden melatonina

[US 9289428 B2] describe la administración intratumoral de antioxidantes como terapia para el cáncer ocular mediante la disminución de la formación de radicales libres en el tumor. Sin embargo, aunque la formulación contempla la posibilidad de utilizar

35

melatonina, describe una dosis de 19 pg/ml de melatonina para ejercer sus efectos antioxidantes. A estas concentraciones la melatonina produce un efecto que no aumenta la función mitocondrial, por lo que no se producen los radicales libres que pueden activar la muerte celular.

5

Por tanto, aunque es conocido que la melatonina inhibe la proliferación celular y aumenta la muerte celular siempre que entre en la célula tumoral en cantidades adecuadas, hasta el momento, no se ha descrito un uso de melatonina que permita reducir las recidivas en el tratamiento del cáncer, así como la resistencia a los

10

tratamientos oncostáticos.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administración intratumoral que comprende unas concentraciones elevadas de melatonina, derivados de melatonina o metabolitos, de forma que la melatonina ejerce un efecto oxidante, en contraposición de su uso habitual y, en particular, de lo preconizado, por ejemplo, en [US 9289428 B2]. Aumenta la función mitocondrial y, en consecuencia, la producción de radicales libres produciendo una activación de la muerte celular.

15

20

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de melatonina, en particular el uso de la composición intratumoral mencionada, para el tratamiento de tumores, preferentemente para la eliminación de tumores.

25

La invención también describe un método de tratamiento que comprende la administración intratumoral de una cantidad terapéuticamente efectiva de melatonina.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

30

**Figura 1.-** Análisis de la penetración de melatonina en células tumorales. Se observa que la melatonina entra fácilmente en las células tumorales de forma dosis-dependiente en los experimentos *in-vitro*. Alcanza unos niveles máximos de 450 ng/mg proteínas tras incubar las células con melatonina a una dosis de 1500  $\mu$ M durante 24 horas.

**Figura 2.-** Análisis de la penetración en el tumor de melatonina administrada por vía subcutánea. Se observa que la melatonina entra en el tumor en cantidades muy pequeñas (10 ng/kg) cuando se administra por vía subcutánea, a pesar de que se administra a dosis muy elevadas (300 mg/kg) durante un tiempo prolongado (21 días).

5 .

**Figura 3.-** Análisis del volumen del tumor comparando la administración de melatonina por vía intratumoral en comparación con el control. Sin embargo, cuando la melatonina alcanza el tumor por vía sistémica, la reducción del volumen del tumor es mucho menor, a pesar de que se ha administrado a dosis altas.

10

**Figura 4:** Análisis del volumen del tumor mediante análisis de RMN. El tamaño del tumor se midió a los 21 de tratamiento. En el control se observa un tumor mucho más denso y más irrigado. Cuando la melatonina alcanza el tumor por vía sistémica, el volumen del tumor disminuye, aunque el efecto no sea muy significativo. Sin embargo, cuando la melatonina se administra por vía intratumoral, la reducción del volumen del tumor es tan drástica que apenas se puede observar.

15

**Figura 5.-** RMN realizado a los 28 días de tratamiento. Se observa un aumento del volumen del tumor considerable con respecto al control de los 21 días (gráfica anterior). Sin embargo, el tumor de los ratones tratados con melatonina administrada por vía intratumoral prácticamente ha desaparecido. No se observa apenas actividad tumoral.

20

**Figura 6.-** Análisis de las mitocondrias y crestas. Se observa que la melatonina aumenta el número de mitocondrias así como el número de crestas (Fig. 6A). También aumenta el DNA mitocondrial (Fig. 6B) y la masa mitocondrial (Fig. 6C). El resultado es un aumento de los complejos de la cadena respiratoria y, en consecuencia, un aumento del consumo de oxígeno (6D), lo cual está relacionado con un aumento de radicales libres (6E) y de estrés oxidativo. Este aumento de radicales libres induce la muerte celular en las células tumorales.

25

30

**Figura 7.-** Estudio de la actividad de los enzimas antioxidantes GPx y GRd en las células tumorales CAL-27. Se observa que la melatonina no aumenta la actividad de estos enzimas (7A). Sin embargo, observamos que el consumo de oxígeno mitocondrial en las células SCC-9 es mucho menor y, en consecuencia, la producción de radicales libres (7B). La melatonina tiene un menor efecto en estas células porque entra en cantidades menores.

35



## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### Definiciones

5 El término "administración intratumoral" empleado en este documento incluye cualquier técnica que permita introducir un compuesto de fórmula general X, en particular melatonina, en el interior de un tumor. Entre estas técnicas se incluyen la inyección, electroporación o electropermeabilización, administración mediada por ultrasonidos, cremas, lociones u otras formas de administración.

10

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de este documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición según la invención para mejorar o eliminar una enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad o condición en un mamífero, preferentemente en cánidos o humanos, más preferentemente en perros. "Tratamiento" también abarca la mejora o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. Concretamente, el concepto "tratar" se puede interpretar como:

- 15 i. Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 20 ii. Aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causa la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- iii. Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

De forma particular, el término tratamiento incluye la destrucción selectiva de las células tumorales, y, en particular, la eliminación total de un tumor.

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término "comprende", que también podrá interpretarse como "consiste en", y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

30

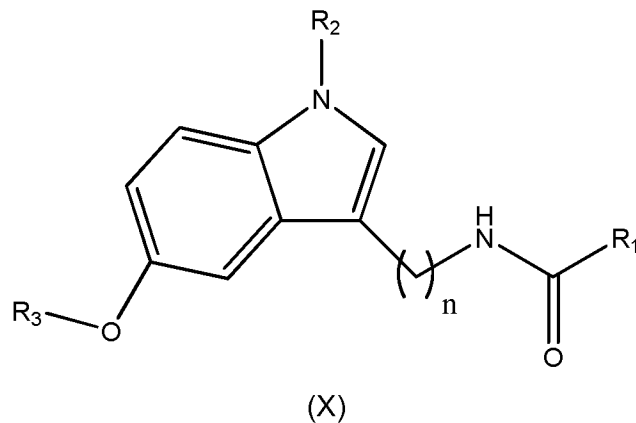
### Composiciones farmacéuticas

35

En un segundo aspecto, la invención proporciona formulaciones, formas o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores mediante administración intratumoral, en adelante "composiciones de la invención" que comprenden como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto derivado de melatonina.

En una realización particular, las composiciones de la invención son aptas para el tratamiento de tumores malignos, preferentemente tumores asociados al cáncer de cabeza y cuello, melanoma, tumores mamarios o asociados al cáncer de mama, tumores oculares, tumores urológicos, como tumores testiculares, y tumores hepáticos como el hepatocarcinoma, de cuello de útero, linfomas, de tiroides, sarcoma de partes blandas.

El derivado de melatonina se define de acuerdo con la fórmula X, e incluye sales, profármacos o solvatos del mismo:



20 donde:

n es un número entero entre 1 y 4; preferiblemente de 1, 2 o 3.

R1 y R3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C1-C4, lineal o ramificado;

25 R2 es hidrógeno, alquilo (C1-C4), lineal o ramificado, un grupo -C(=O)O-Ra o un grupo -C(=O)-N(H)-Ra, en donde Ra es un grupo alquilo (C1-C4), lineal o ramificado;

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc.5 Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 2 átomos de carbono. Y máspreferiblemente son un grupo metilo.

5

En una realización preferente, el ingrediente activo de la composición de la invención es melatonina (N-acetyl-5-metoxi-triptamina), una sal, profármaco o solvato de la misma.

El término "melatonina" se refiere a la N-acetil-5-metoxi-triptamina, también denominada  
10 en la literatura melatonin, melatonine, melatol, melovine, circadin, regulin, acetaminde, N-acetyl-methoxy-tryptamine, 5-methoxy-Nacetyltryptamine, N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide o N-[2-(5-15 methoxyindol-3-yl)ethyl]acetamide o cuando en el compuesto de fórmula general (I) R1 y R3 son un grupo metilo, n es 1 y R2 es hidrógeno.

15 El número CAS de la melatonina es el 73-31-4.

Por lo tanto la presente invención también se refiere a las sales farmacéuticamente aceptables de melatonina o de sus derivados que pueden ser generadas mediante métodos químicos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, mediante una  
20 reacción con un ácido en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Como disolvente orgánico puede utilizarse éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Los ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato,  
25 maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y ptoluenosulfonato..

El término "profármaco" tal como se usa en esta solicitud se refiere a un compuesto químico que ha experimentado una derivación química, por ejemplo una sustitución o  
30 una adición de un grupo químico adicional, para modificar cualquiera de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad o biodisponibilidad, pero que no modifica las características técnicas de la molécula original. Un profármaco podría ser por ejemplo un derivado de éster, de éter o de amida. La biodisponibilidad se refiere a la disponibilidad del mismo en un compartimento biológico concreto.

35

El término "solvato" según esta invención ha de entenderse como aquel derivado de melatonina que tiene otra molécula, por ejemplo un disolvente polar, unido por medio de un enlace no covalente. Los ejemplos de tales solvatos incluyen hidratos y alcoholatos, por ejemplo metanolatos

5

La preparación de sales, solvatos y profármacos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Las sales, solvatos o profármacos no farmacéuticamente aceptables también se encuentran dentro del alcance de la invención puesto que pueden ser útiles en la preparación de sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables. La composición de la invención de la invención también se puede referir a una composición que comprende un equivalente biológico funcional de la melatonina en una concentración que sea equivalente a la descrita en las composiciones de la invención.

10

15

El término "equivalente biológico funcional" o "variable bioequivalente" tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula con la misma función que la molécula descrita, que puede presentar ligeras variaciones con respecto a la molécula descrita sin que dichas variaciones aporten ningún efecto técnico añadido a dicha molécula. En la presente invención se refiere por lo tanto a variantes de melatonina que presenten la misma función y que presenten ligeras variaciones sin que dichas variaciones aporten ningún efecto técnico añadido a la melatonina.

20

Por "concentración que sea equivalente" se entiende aquella concentración necesaria para el equivalente biológico funcional de melatonina que produzca el mismo efecto que el descrito en la presente invención por la composición de la invención.

25

La melatonina también se produce en vegetales. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de melatonina en algas, plantas comestibles, cereales, frutos, semillas, raíces, tallos, hojas y hierbas medicinales. Por ejemplo se ha descrito la presencia de melatonina en el cacao, las uvas, los tomates, el té, el té verde, algas, cereales y las aceitunas. Por lo que el origen de la melatonina de la composición de la invención puede ser vegetal. La obtención de la melatonina de origen vegetal (también denominada fitomelatonina) se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia para tal fin.

30

35

El origen de la melatonina utilizada en la composición de la invención también puede ser sintético. La síntesis química de la melatonina se puede realizar mediante las técnicas conocidas por el experto en la materia para tal fin.

- 5 En una realización particular, la composición de la invención es apta para administración por inyección intratumoral.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, el tipo de tumor, preferentemente mamífero y  
10 más preferentemente humano.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de un compuesto de la invención que cuando se administra a un mamífero, preferentemente humanos, es suficiente para producir el  
15 tratamiento, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia humanos. La cantidad del compuesto X, metabolito, sal, solvato o profármaco que constituye una cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad del compuesto específico empleado; la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la especie (preferentemente humana), el tipo de  
20 tumor, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; la vía de administración; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

25 En una realización particular la concentración que da lugar a la cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula X, preferentemente melatonina, es superior a 0,1% (p/v) sobre el total de la composición administrada. Preferentemente, esta concentración es superior al 0,2% (p/v), más preferentemente superior al 0,3%  
30 (p/v), aún más preferentemente está comprendida entre 0,3 y 5% (p/v) y aún más preferentemente está comprendida entre 0,3 y 4,5% (p/v).

En una realización particular, en la que la administración se realiza mediante inyección intratumoral, la concentración del compuesto de fórmula X, preferentemente melatonina,  
35 que da lugar a la cantidad terapéuticamente efectiva es superior a 0,1% (p/v) sobre el total de la composición administrada, preferentemente superior al 0,2% (p/v), más

preferentemente comprendida entre 0,2% y 0,5% y aún más preferentemente, del 0,3% (p/v).

5 Por tanto, en comparación con la concentración descrita en el estado de la técnica, la composición de la invención comprende melatonina con una concentración de al menos 0,16 millones de veces superior.

10 Dichas formulaciones puede contener cualquier otro ingrediente activo en el tratamiento de tumores o bien caracterizarse por contener como principio activo únicamente un compuesto de fórmula general **X** o una combinación de compuestos de fórmula general **X**.

15 Otra realización preferida se refiere al uso donde la composición además comprende al menos otro principio activo. Como se emplea aquí, los términos "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del ser humano u otros animales. Por ejemplo, se  
20 podría utilizar otras moléculas oncostáticas.

Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de agentes terapéuticos, además de los compuestos de la invención, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso  
25 de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico, tal y como en el tratamiento de enfermedades o afecciones que directa o indirectamente modulan la función de la sustancia.

De acuerdo con la presente invención, la "forma farmacéutica" es la disposición  
30 individualizada a la que se adaptan los fármacos (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) para constituir un medicamento.

Las formulaciones pueden contener además excipientes o adyuvantes farmacéuticamente aceptable.

35

Los excipientes y los vehículos empleados tienen que ser farmacéutica y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado.

5

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica o medicamento de la invención, estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda a su preparación en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad,

10

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", o farmacológicamente aceptable, se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensoactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del producto de expresión de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la invención pueden ser los conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, lisosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, miliesferas, microesferas, nanoesferas, milipartículas, micropartículas y nanopartículas.

15

20

25

La mejor forma de administración dependerá del tipo de tumor y del estado del paciente.

30

En el caso de administración inyectable, un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable es Propilenglicol (PG) al 10% y solución salina isotónica.

35

Las composiciones farmacéuticas o formulaciones deben ser adecuadas para su administración intratumoral, ya sea mediante inyección, electroporación o electropermeabilización, administración mediada por ultrasonidos, cremas, lociones u otras formas de administración.

El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que potencie la respuesta de un principio activo. En la presente invención se refiere a cualquier sustancia que potencie los efectos de la composición de la invención, puede referirse a cualquier adyuvante conocido por el experto en la materia.

5

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

- 10 Otra realización preferida se refiere al uso donde la composición además comprende un agente gelificante. Preferiblemente el agente gelificante se selecciona de la lista que comprende copolímero de polietileno y polipropileno, celulosa y goma guar. Preferentemente se refiere a copolímero de polietileno y polipropileno. Por lo aquí descrito, otra realización referida se refiere al uso donde la composición es un gel (o
- 15 también denominado "hidrogel").

En el caso de administración intratumoral, en particular administración inyectable, de un gel, un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución isotónica de pluronic al 5%.

20

El término "agente gelificante" se refiere a una sustancia que conforma un gel, es decir, una red tridimensional formada por el agente gelificante y que generalmente contiene una fase líquida.

- 25 Así, los agentes gelificantes que pueden utilizarse para fabricar el gel que se administra intratumoralmente pueden ser aquellos conocidos por el experto en la material para la elaboración de una composición farmacéutica. Por ejemplo, entre los copolímeros de polietileno y polipropileno se podría utilizar copolímeros de poloxamer (o poloxamer), por ejemplo los agentes denominados Pluronic®, entre ellos, Pluronic® F127 (número
- 30 CAS 9003-11-6) o Pluronic® F127NF.

En otra realización preferida, la composición además comprende al menos un conservante.

- 35 Se entiende por "conservante" aquella sustancia que mantenga las propiedades del medicamento al inhibir la contaminación por gérmenes, pueden ser conservante iónico



o no-iónico. El conservante empleado no será tóxico, será estable químicamente, y compatible con la melatonina. Como agentes conservantes pueden utilizarse los conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, el conservante puede referirse a ácido benzóico, benzoato sódico, ácido ascórbico, sorbato potásico, metilparaben, etilparaben  
5 o butilparaben. Se entiende por "gérmenes" cualquier célula que pueda crecer y multiplicarse en la composición de la invención, por ejemplo bacterias, hongos y levaduras.

Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de  
10 las particularidades de la terapia.

Las composiciones de la invención se preparan utilizando métodos habituales tales como aquéllos descritos o a los que se hace referencia en las Farmacopeas Española y Estadounidense y textos de referencia similares.

15

### **Preparaciones combinadas**

El término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta  
20 memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

25

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición, preparación o forma farmacéutica apta para su administración intratumoral, de ahora en adelante "preparación combinada de la invención", que comprende:

a) una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula general **X**,  
30 preferentemente melatonina, y

b) otro principio activo frente a tumores.

### **Kit de la invención**

35

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit ("*kit-de-partes*", del inglés "*kit of parts*") para la preparación de la composición o de la preparación combinada de la invención.

5 El término "kit", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de componentes adecuados para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención, que pueden estar o no empaquetados juntos, junto con sus contenedores y envases apropiados para su venta comercial, etc.

10

En la presente invención, se entiende como "*componente adecuado para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención*", a cualquier compuesto que puede usarse para la obtención de las mismas, e incluye, sin limitación, soluciones acuosas, preparados sólidos, tampones, jarabes, soluciones de preservación, aromatizantes, correctores de pH, espesantes, etc.

15

Los componentes del kit se pueden proporcionar en viales separados (en forma de "*kit-de-partes*") o en un único vial. Además, se entiende que el kit de la presente invención está destinado a la preparación de la composición o de la preparación combinada o de la forma farmacéutica de la invención. Preferiblemente, los componentes del kit de la presente invención están listos para ser usados para preparar la composición o la preparación combinada o la forma farmacéutica de la presente invención. Además, el kit contiene preferiblemente instrucciones explicativas acerca de cómo preparar la composición o la preparación combinada o la forma farmacéutica de la presente invención. Las instrucciones se pueden proporcionar a los usuarios en forma electrónica o en papel.

20

25

Por lo tanto, la invención proporciona un kit para la preparación de la composición de la invención o de la preparación combinada de la invención un recipiente que comprende un envase con el compuesto de fórmula general **X** en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable, junto con componentes adecuados para la obtención de la composición o de la preparación combinada de la invención.

30

35

De forma particular, el kit de la invención comprende, además, un envase con el compuesto de fórmula general **X** en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable.

**Uso de los compuestos de la invención**

5 Un tercer aspecto de la invención consiste en uso de un compuesto de fórmula general X, una sal, un solvato o un profármaco del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor, en el que la composición farmacéutica se administra intratumoralmente.

10 Consecuentemente la invención se refiere al uso de las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención como medicamento o para la elaboración de un medicamento apto para el tratamiento de tumores, preferentemente tumores sólidos, más preferentemente tumores malignos.

15 Un tumor se considera maligno cuando las células que lo forman tienen capacidad para extenderse a otras áreas del organismo y también pueden crecer en estos órganos, produciéndose la metástasis.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por un tumor, en adelante "método de tratamiento de la invención" mediante el uso de los compuestos y/o las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención. Los efectos de este método de tratamiento incluyen, pero no se limitan, a los efectos de eliminación del tumor, el incremento del tiempo de progresión de la enfermedad y al índice de supervivencia. Los efectos del tratamiento incluyen a más largo plazo el control de la enfermedad.

25 En una realización preferente, el tratamiento consiste en la eliminación total del tumor.

Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que lo incluya.

30 La cantidad administrada depende del tamaño y localización del tumor.

De forma preferente se administra entre 30 y 100µl, preferentemente entre 40 y 80µl, más preferentemente 60 µl de composición de la invención por cada 100 mm<sup>3</sup> de tumor.

35

En una realización preferente, el tumor que se trata empleando las composiciones y/o las preparaciones combinadas y/o el kit de la invención y/o el método de tratamiento de la invención es un tumor maligno seleccionado del grupo formado por tumores cancerígenos, preferentemente tumores asociados al cáncer de cabeza y cuello, melanoma, tumores mamarios o asociados al cáncer de mama, tumores oculares, tumores urológicos, como tumores testiculares, y tumores hepáticos como el hepatocarcinoma, de cuello de útero, linfomas, de tiroides y sarcoma de partes blandas.

10

La administración de las composiciones de la invención, en solitario o en combinación con otros compuestos, composiciones o medicamentos, se puede llevar a cabo por medio de los modos de administración de agentes aceptados para servir a similares utilidades.

15

### **MODOS DE REALIZACIÓN**

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención:

20

#### **Metodología**

En primer lugar se demostró que la melatonina aumenta los niveles de radicales libre en la célula. Hemos estudiado la relación entre los cambios mitocondriales que produce la melatonina y la muerte celular inducida por esta molécula en estas células tumorales. La melatonina aumenta el número de mitocondrias así como el número de crestas, el DNA y la masa mitocondrial. El resultado es un aumento de los complejos de la cadena respiratoria y, en consecuencia, un aumento del consumo de oxígeno, lo cual esta relacionado con un aumento de radicales libres y de estrés oxidativo que se reflejó por un aumento del índice GSSG/GSH. Sin embargo, la capacidad antioxidante no se modifica. No se modifica ni la actividad ni la expresión de los enzimas antioxidantes como la GPx y la GRd . Si encontramos un ligero aumento de la SOD. Por otro lado, las células SCC-9, más resistente a la melatonina, presentan menos cambios mitocondriales con la melatonina y, en consecuencia, menos producción de ROS.

30

35

Por otro lado hemos demostrado, que aunque aumenten el número de mitocondrias, no son mitocondrias funcionales ya que no aumenta la producción de ATP. Sin embargo, los estudios de metabolómica demuestran que aumentan todos los intermediarios de Krebs. Es decir que aumenta la actividad mitocondrial y, en consecuencia, los radicales libres que inducen la muerte celular.

Para llevar a cabo los ensayos se han utilizado células CAL-27 y SCC9 como típico ejemplo de células carcinoma de células escamosas de cáncer de cabeza y cuello (HNSCC).

10

Para los ensayos *in vivo* se han utilizado ratones nude athimic (nu/nu) (Janvier, Pays De La Loire, Francia) de aproximadamente 5–6 semanas de edad (18-20 g). Los animales se han estabulado en el animalario del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada (CIBM), en condiciones estériles y bajo un ambiente de fotoperíodo (12:12 h) y temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controlados, y agua y dieta de laboratorio ad libitum. La manipulación y trasplante de los animales se ha llevado a cabo en una campana de bioseguridad de flujo laminar. Los animales se han anestesiado con una inyección i.p. de ketamina (80 mg/kg) y xylazina (4 mg/kg).

20

Los xenoinjertos se han realizado con las células CAL-27 y SCC9 (éstas últimas resistentes a la melatonina). Las células separadas enzimáticamente con Tripsina-EDTA se resuspenden a una concentración de  $4 \times 10^6$  células por ratón en PBS. Se determina la viabilidad celular mediante el test de Trypan Blue. Las células se inyectan en el flanco izquierdo del ratón, siendo inyectado a cada ratón un volumen de 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular con ayuda de una jeringa de 1 mL con aguja de 16 x 0,5 mm.

25

El peso corporal y el tamaño del tumor se miden y registra dos o tres veces por semana durante el período de experimento. El volumen del tumor se calcula utilizando la siguiente fórmula:  $1/2 (L \times W^2)$  ( $\text{mm}^3$ ), donde L es la longitud y W es la anchura. Después de la aparición de un nódulo tumoral ( $100 \text{ mm}^3$ ), los ratones portadores de tumores se asignan aleatoriamente a varios grupos.

30

Los grupos experimentales han sido los siguientes:

35

1. Ratón con tumor sin tratar

2. Ratón con tumor y tratado con melatonina administrada por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 300 mg/kg (solución de melatonina al 4,5% p/v). La concentración de melatonina en el tumor cuando la melatonina se administra por esta vía es de 10 ng/mg de proteínas.
- 5 3. Ratón con tumor y tratado con melatonina administrada por vía intratumoral (60 µl de una solución de melatonina al 0,1% p/v) para un volumen del tumor de 100 mm<sup>3</sup>. El 0,1% de melatonina es la dosis mínima efectiva (in vitro) para inducir un 80% de muerte celular. Cuando la melatonina se administra al 0,1%, en el tumor se alcanza una concentración de 450 ng/mg de proteínas.
- 10 4. Ratón con tumor y tratado con melatonina administrada por vía intratumoral (60 µl de una solución de melatonina al 4,5%) para un volumen del tumor de 100 mm<sup>3</sup>

El 4,5% de melatonina es la dosis máxima utilizada por vía s.c. in vivo.

15

Por tanto, una vez alcanzado el tumor el volumen indicado de 100 mm<sup>3</sup> se trata con melatonina diariamente durante 21 días según el siguiente protocolo:

- A. Inyectada por vía s.c. (300 mg/kg que equivale a una solución del 4,5%)
- 20 B. Inyectada directamente en el tumor (60 µl de una solución de melatonina al 0,1%)
- C. Inyectada directamente en el tumor (60 µl de una solución de melatonina al 4,5%)
- D. Inyectada directamente en el tumor (60 µl de una solución de melatonina al 0,1%) hasta desaparición total del tumor.
- E. Se han realizado fotos del tumor al final del tratamiento de cada uno de los
- 25 grupos. Asimismo se ha realizado un análisis por RMN al finalizar el tratamiento para ver la actividad tumoral.

### **Resultados:**

#### 30 Análisis de resultados in vitro

En los experimentos **in-vitro** se incubaron las células tumorales con diferentes concentraciones de melatonina. Se observó que la melatonina entra fácilmente en las células tumorales alcanzando unos niveles de 450 ng/mg proteínas tras incubar las células con melatonina a una dosis de 1500 µM durante 24 horas (Figura 1).

35

Se ha demostrado que la melatonina, a altas concentraciones, activa los mecanismos apoptóticos en las células tumorales al actuar en las mitocondrias de dichas células, además de potenciar los efectos citotóxicos de la radio y de la quimioterapia. Se ha observado una disminución significativa del tamaño y del número de colonias de las células tumorales (CAL-27) tratadas con melatonina e irradiadas. La melatonina aumenta la apoptosis de forma dosis y tiempo dependiente. También se ha observado una inhibición de la proliferación celular y una parada del ciclo celular en la fase S y en G2. Se ha estudiado la relación entre los cambios mitocondriales que produce la melatonina y la muerte celular inducida por esta molécula en estas células tumorales.

La melatonina aumenta la masa mitocondrial, el ADNmit, el número de mitocondrias así como el número de crestas mitocondriales. El resultado es un aumento de los complejos de la cadena respiratoria y, en consecuencia, un aumento del consumo de oxígeno, lo cual está relacionado con un aumento de radicales libres y de estrés oxidativo. Además, se observa que la melatonina no aumenta la actividad los enzimas antioxidantes como la GPx o GRd, lo que conduce a una producción aún mayor de radicales libres. Es decir, los efectos citotóxicos de la melatonina en las células tumorales están relacionados con un aumento de la función mitocondrial y, a su vez, el aumento de la función mitocondrial en la célula tumoral induce los procesos de apoptosis, lo que conlleva también a una inhibición de la síntesis de proteínas. Por otro lado, se ha comprobado que las células de cáncer de cabeza y cuello SCC-9 son más resistente a la melatonina al mismo tiempo que se observa un menor efecto sobre la función mitocondrial y, por tanto, una menor producción de radicales libres. Estos resultados indican que la melatonina entra en menor concentración en estas células.

#### 25 Análisis de resultados in vivo

En ratones xenotrasplantados con células Cal-27 se ha realizado un estudio dosis-respuesta con melatonina y observamos que la máxima cantidad de melatonina que entra en el tumor después de 21 días de tratamiento es tan solo de 14 ng/mg de proteínas a pesar de utilizar dosis de hasta 300 mg/kg. Sin embargo, en los experimentos in vitro, los niveles de melatonina alcanzan los 450 ng/mg proteínas a las 24 horas de tratamiento con melatonina 1500  $\mu$ M. Por tanto, existe algún mecanismo que dificulta la entrada de melatonina en la célula tumoral en el tumor in vivo así como en determinados tipos de células tumorales.

35 En los experimentos *in-vivo*, se ha administrado la melatonina por vía subcutánea a una dosis de 300 mg/kg. Sin embargo, se ha observado que la cantidad de melatonina que

entra en el tumor es escasa (14 ng/mg de proteínas) a pesar de administrar una dosis de melatonina de 300 mg/kg de peso del ratón (Figura 2), lo que indica que existe algún mecanismo que impide la entrada de melatonina en cantidades suficientes para ejercer sus efectos en la célula tumoral.

5

La concentración de melatonina medida en los tumores se realizó tras su sacrificio a los 21 días. La concentración de melatonina cuando se inyecta directamente en el tumor no se ha podido medir debido a la escasa cantidad de muestra teniendo en cuenta que el tumor prácticamente desaparece.

10

Por otro lado, cuando se administra la melatonina por vía subcutánea a una dosis de 300 mg/kg, el volumen del tumor disminuye con respecto al control (Fig. 3). Ni aumentando la dosis de melatonina por encima de 300 mg/kg de peso ni aumentando los días de tratamiento se observa un incremento del efecto de la melatonina en el tumor.

15

Es decir, no entra más melatonina en el tumor. Sin embargo, el volumen del tumor disminuye drásticamente a los 21 días de tratamiento cuando la melatonina se inyecta directamente en el tumor (inyección intratumoral), y desaparece totalmente a los 28 días de tratamiento.

20

En las imágenes de RMN (Fig. 4), se observan ciertas zonas necróticas en los tumores tratados con melatonina administrada por vía s.c. Mediante el análisis de RMN se observa que la disminución del volumen del tumor no es tan evidente como la que se observa en las fotografías (Fig. 3). Sin embargo, cuando se inyecta la melatonina directamente en el tumor, se produce una disminución drástica del volumen del tumor,

25

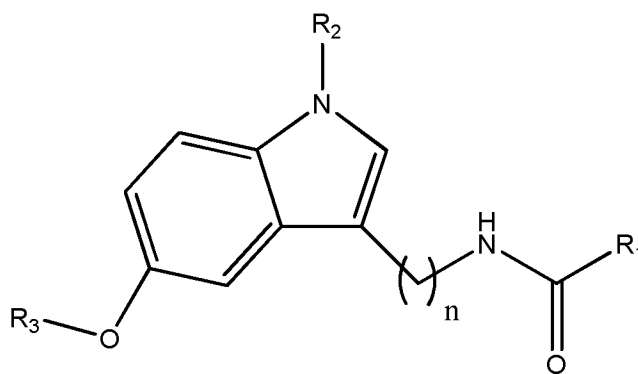
desapareciendo prácticamente del todo a los 21 días de tratamiento. A los 28 días desaparece totalmente el tumor no quedando prácticamente rastro de actividad tumoral. Por el contrario, el tumor en el grupo control presenta un g tamaño muy aumentado con respecto al que se observa a los 21 días y con carácter invasivo (Figura 5).

30



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un compuesto de fórmula general X, una sal, un solvato o un profármaco del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor, en el que la composición farmacéutica se administra intratumoralmente.



10

(X)

donde:

n es un número entero entre 1 y 4; preferiblemente de 1, 2 o 3.

15

R1 y R3 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C1-C4, lineal o ramificado;

R2 es hidrógeno, alquilo (C1-C4), lineal o ramificado, un grupo -C(=O)O-Ra o un grupo -C(=O)-N(H)-Ra, en donde Ra es un grupo alquilo (C1-C4), lineal o ramificado;

20

2. Uso según reivindicación anterior, caracterizado porque el compuesto X es melatonina (), una sal, un solvato o un profármaco de la misma.
- 25 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la concentración del compuesto X es superior a 0,1% (p/v) sobre el total de la composición administrada.

4. Uso, según reivindicación anterior, en el que la concentración del compuesto X es superior al 0,3% (p/v) sobre el total de la composición administrada.
- 5 5. Uso, según reivindicación anterior, en el que la concentración del compuesto X está comprendida entre 0,3 y 5% (p/v) sobre el total de la composición administrada.
- 10 6. Uso, según cualquier de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la composición es apta para administración mediante una inyección intratumoral.
- 15 7. Uso, según reivindicación anterior, en el que la concentración del compuesto X es de 0,3% (p/v) sobre el total de la composición administrada.
8. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de tumores, preferentemente tumores sólidos.
- 20 9. Uso según reivindicación anterior caracterizado porque el tumor es un tumor cancerígeno.
- 25 10. Uso según la reivindicación anterior caracterizado porque el tumor se selecciona del grupo formado por tumor es asociados al cáncer de cabeza y cuello, melanoma, tumores mamarios, tumores oculares, tumores urológicos, tumores hepáticos, de cuello de útero, linfomas, de tiroides y sarcoma de partes blandas.
- 30 11. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la composición además comprende otro principio activo.
- 35 12. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

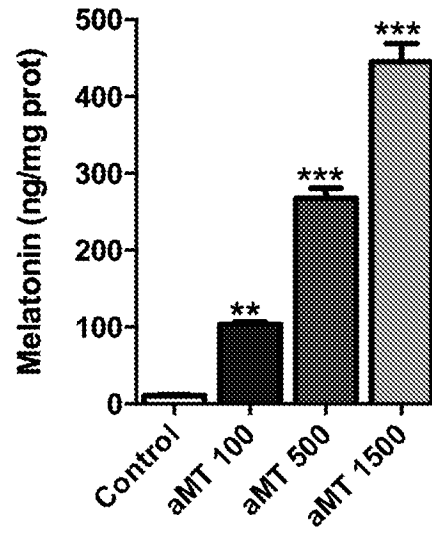


Figura 1

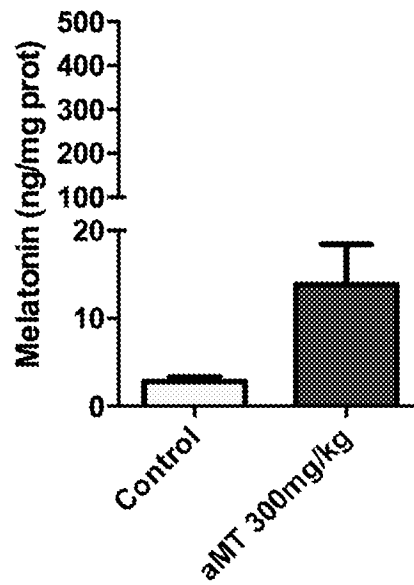
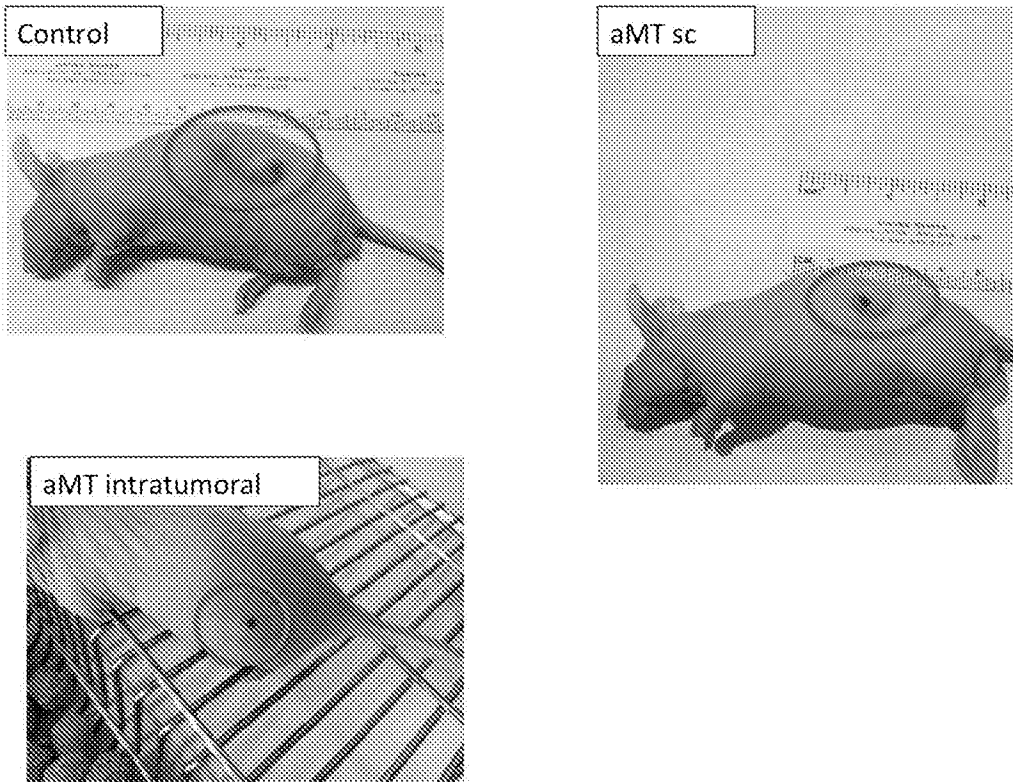


Figura 2



**Figura 3**

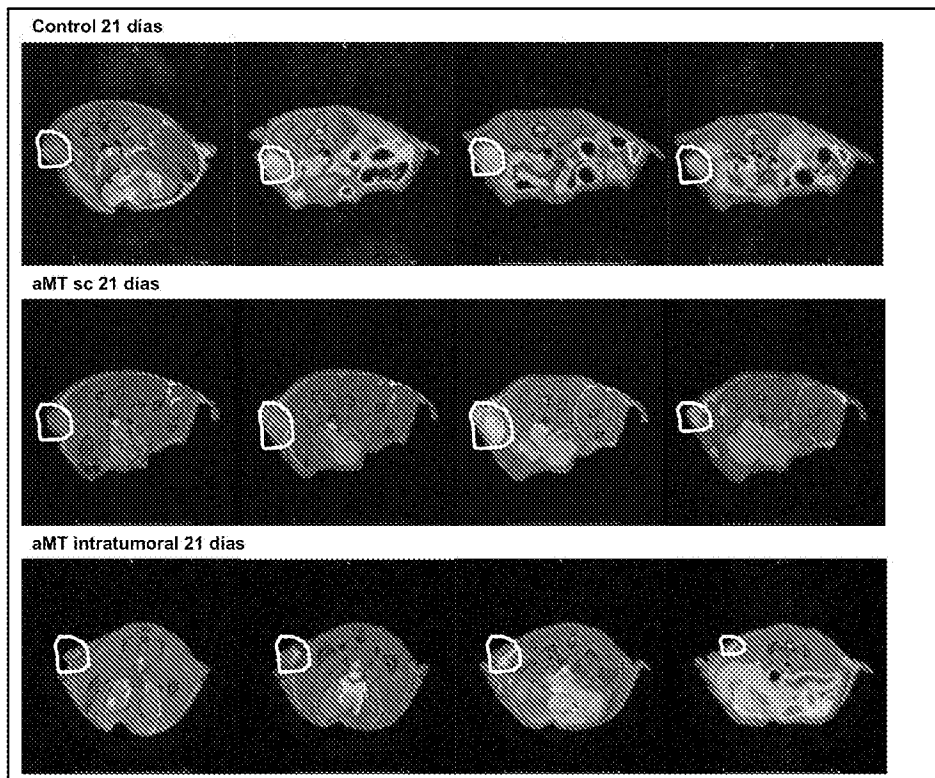


Figura 4

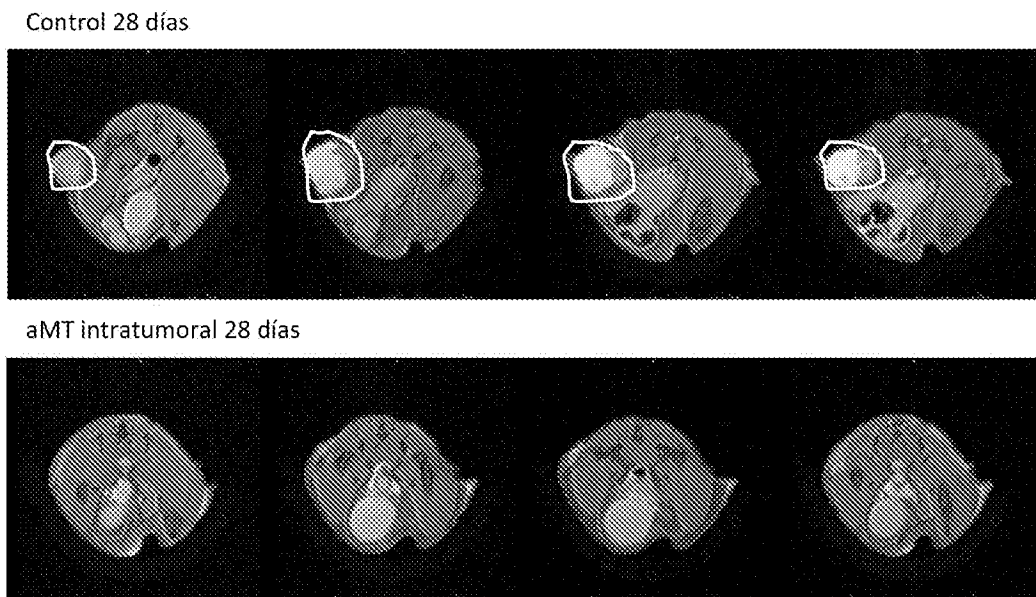


Figura 5

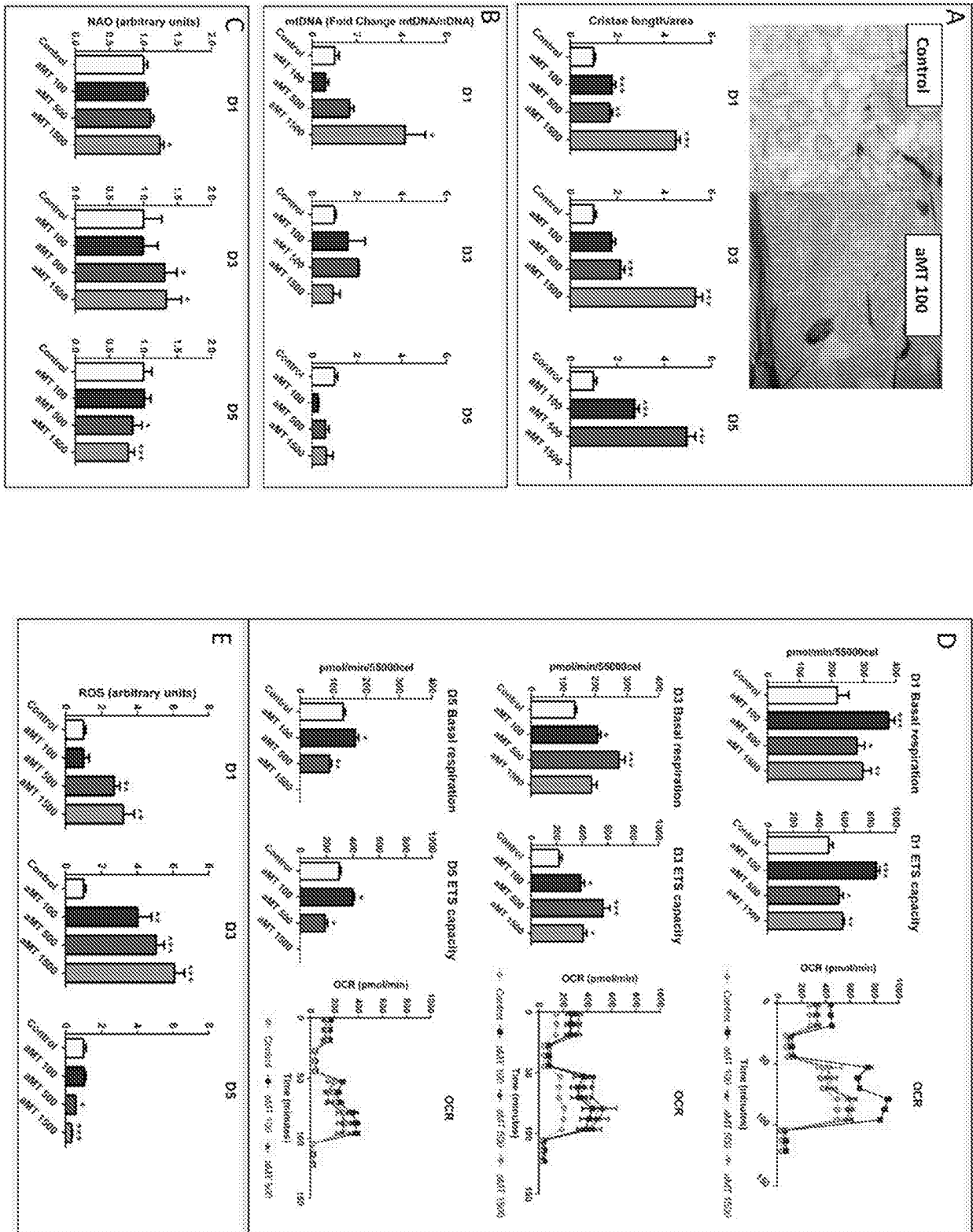


Figura 6

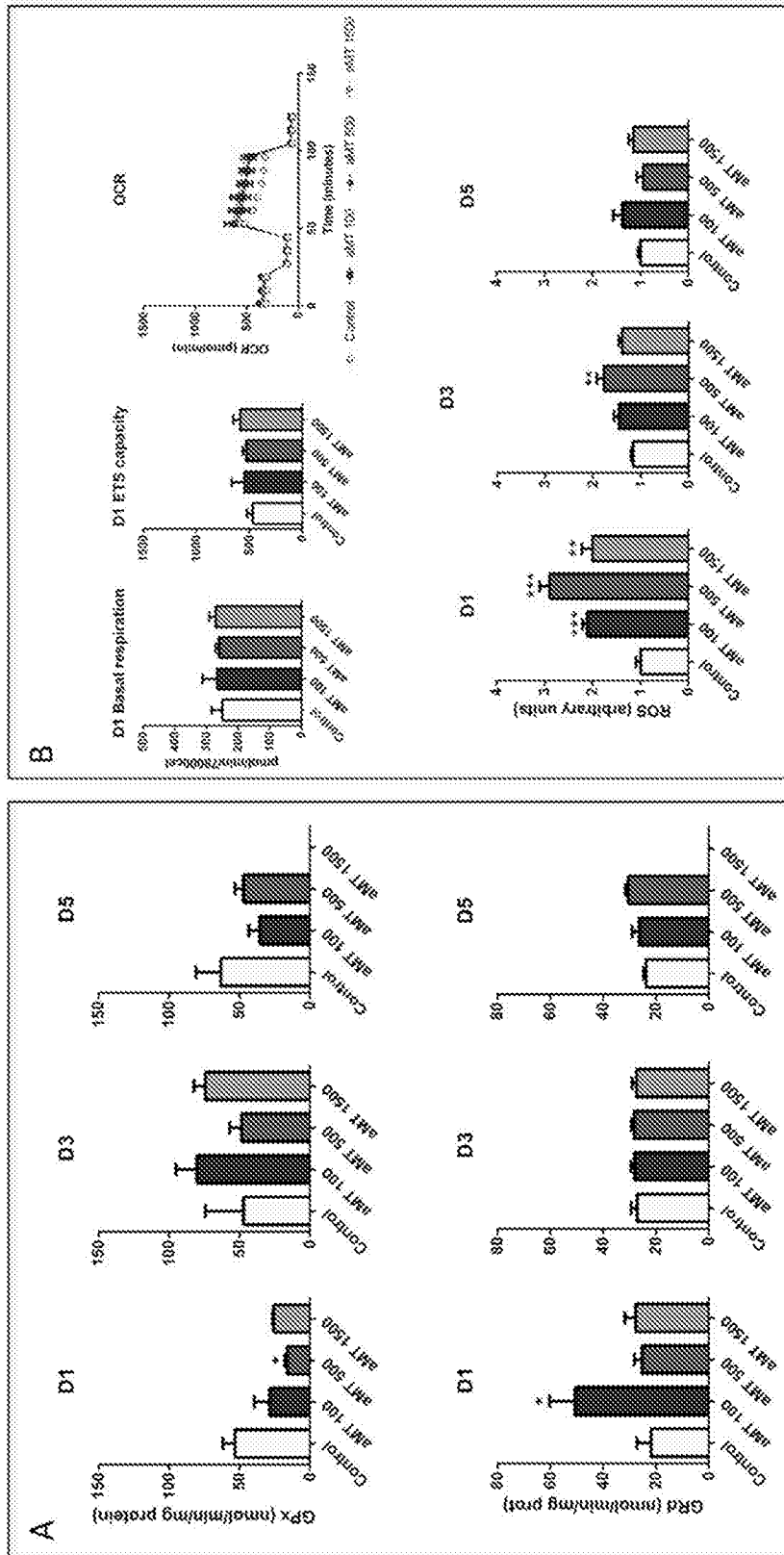


Figure 7



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201730598

22 Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2017

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: **A61K31/4045** (2006.01)  
**A61P35/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2014329785 A1 (WONG VERNON G et al.) 06/11/2014, página 4, párrafo 33, ejemplos 1, 5, reivindicaciones	1,2,6,8-12
A	Hong Yunkyung et al.. MELATONIN TREATMENT INDUCES INTERPLAY OF APOPTOSIS, AUTOPHAGY, AND SENESCENCE IN HUMAN COLORECTAL CANCER CELLS. Journal of Pineal Research APR 2014. 31/03/2014, Vol. 56, N° 3, Páginas 264-274, ISSN 0742-3098(print) ISSN 1600-079X(electronic), <DOI: doi:10.1111/jpi.12119>. todo el documento	1-12
A	Park Shi-Young et al.. MELATONIN SUPPRESSES TUMOR ANGIOGENESIS BY INHIBITING HIF-1ALPHA STABILIZATION UNDER HYPOXIA.. Journal of pineal research England Mar 2010. 28/02/2010, Vol. 48, N° 2, Páginas 178 - 184, ISSN 1600-079X (Electronic), <DOI: pubmed: 20449875>. todo el documento	1-12
A	Trubiani Oriana et al.. MELATONIN PROVOKES CELL DEATH IN HUMAN B-LYMPHOMA CELLS BY MITOCHONDRIAL-DEPENDENT APOPTOTIC PATHWAY ACTIVATION. Journal of Pineal Research NOV 2005. 31/10/2005, Vol. 39, N° 4, Páginas 425-431, ISSN 0742-3098. todo el documento	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
03.04.2018

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/4



Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, BIOSIS,XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.04.2018

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-5, 7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1,2,6,8-12	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-5, 7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1,2, 6, 8-12	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2014329785 A1 (WONG VERNON G et al.)	06.11.2014

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere al uso de un compuesto de fórmula general X, específicamente la melatonina, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del tumor, siendo la administración intratumoral.

El documento D1 se refiere a nuevas formulaciones de antioxidantes de liberación sostenida líquida y sólida para la inyección o implantación intraocular e intratumoral como nuevos métodos de tratamiento de afecciones oculares y tumores / cáncer. Estas formulaciones se pueden implantar, por ejemplo, mediante trócar o mediante introducción con aguja, inyección intratumoral (tal como en el tumor de próstata o en tumores inoperables (tales como gliomas) en el cerebro. En los ejemplos 1 y 5 y en la reivindicación 6 se cita la utilización de melatonina entre otros antioxidantes para los tratamientos citados anteriormente.

Por lo tanto, a la vista del documento anterior, es conocida la utilización de melatonina por administración intratumoral y en el tratamiento de tumores cancerígenos. En consecuencia, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1, 2, 6, 8-12 carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la LP11/86.

Las reivindicaciones 3- 5 y 7 hacen referencia a las concentraciones del compuesto X (entre 0.1 y 5% (p/v) sobre el total de la composición administrada.

En el documento D1, si bien se menciona la melatonina junto con otros antioxidantes y su actividad antitumoral (ver ejemplos 1 y 5), no proporciona información que pueda dirigir al experto en la materia a las formulaciones recogidas en las reivindicaciones 3-5 y 7 de la presente solicitud para las que se muestra un efecto probado.

En consecuencia, las reivindicaciones 3-5 y 7 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/86.