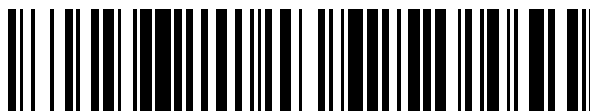


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 734**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2018 PCT/CN2018/094504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019 WO19007368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2018 E 18827765 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 3639829**

54 Título: **Uso de isovaleril espiramicina I o III en la preparación de fármaco para tratar y/o prevenir el tumor y fármaco**

30 Prioridad:

04.07.2017 CN 201710537958

27.12.2017 CN 201711497546

27.12.2017 CN 201711450300

27.12.2017 CN 201711450396

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2022

73 Titular/es:

**SHENYANG FUYANG PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)**

**No.18-12 Yaoyang Street, Shenbei New District
Shenyang, Liaoning 110164, CN**

72 Inventor/es:

JIANG, ENHONG;

HE, WEINQING;

DAI, JIANLU;

JIANG, YANG;

JIANG, XULEIN y

ZHAO, XIAOFENG

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 912 734 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

Uso de isovaleril espiramicina I o III en la preparación de fármaco para tratar y/o prevenir el tumor y fármaco

5 **Campo técnico**

La presente descripción pertenece al campo técnico de los productos farmacéuticos y se refiere específicamente a la isovaleril espiramicina I o III para su uso en el tratamiento o la prevención de un tumor.

10 **Antecedentes**

Un tumor es una enfermedad común y que se produce con frecuencia y se refiere a la neoformación o neoplasia formada por la proliferación y diferenciación anormales clonales provocadas por la mutación genética y la pérdida de la regulación normal del crecimiento y la diferenciación del histocito del organismo bajo la acción a largo plazo de los factores tumorigénicos *in vivo* e *in vitro*. Los tumores se clasifican en tumores benignos y tumores malignos. Los tumores malignos se dividen adicionalmente en tres tipos: carcinomas derivados de tejidos epiteliales, sarcomas derivados de tejidos mesenquimales y carcinosarcomas. El término "cáncer" se usa generalmente para referirse a todos los tumores malignos.

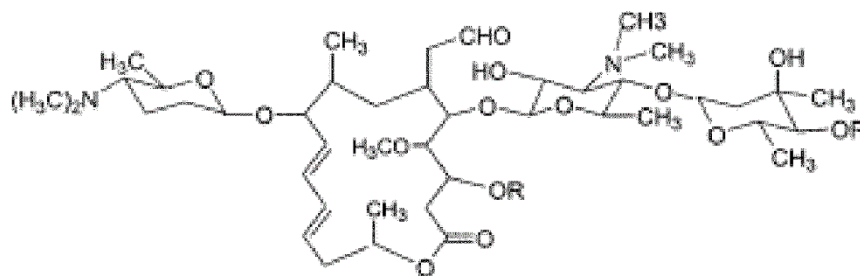
Los tumores malignos son una de las principales enfermedades malignas que amenazan la salud humana y la primera causa de muerte de la población mundial. De acuerdo con las últimas estadísticas, en 2007, aproximadamente 7,9 millones de personas en el mundo murieron por diversos cánceres, que representan el 13 % de todas las muertes y se diagnosticaron más de 12 millones de casos de cáncer, en donde se ha producido el 72 % o más de pacientes y muertes tumorales en países subdesarrollados y se eleva continuamente. En 2015, 9 millones de personas en el mundo murieron por tumores, y se espera que más de 12 millones de personas morirán por tumores en 2030. Actualmente, el número anual de casos de cáncer en China es aproximadamente 2,8 millones y el número de muertes por cáncer es mayor que 400.000, estando clasificado lo primero entre todos los tipos de enfermedades en China y muestra una tendencia creciente. Con la velocidad del ritmo de la vida social, la presión creciente de la competición y los cambios del estilo de vida y el entorno humanos, los casos de tumores y las muertes están aumentando cada año y los tumores se han convertido en las enfermedades comunes y la alta incidencia en la sociedad moderna, afectando de forma grave no solamente a la calidad de la vida de los pacientes, sino también llevando la pesada carga económica y mental a las familias de pacientes y la sociedad. Y los tumores también son importantes problemas sociales en el mundo, el tratamiento y la prevención del cáncer siempre han sido uno de los problemas de presión en el mundo. Actualmente, la quimioterapia es un medio principal de lucha contra tumores. Aunque la quimioterapia tiene un mejor efecto curativo, la quimioterapia a menudo provoca efectos secundarios tales como mielosupresión y funciones inmunitarias bajas, lo que dificulta que los pacientes se adhieran al tratamiento. Y la resistencia al fármaco en el proceso de tratamiento de la quimioterapia se ha convertido en uno de los problemas difíciles en el tratamiento clínico actual. En los últimos años, el mercado global de fármacos antitumorales ha crecido rápidamente. De acuerdo con las estadísticas de la FDA de EE.UU., las ventas totales de fármacos anticancerígenos en el mundo aumentaron de 24 mil millones de dólares de EE.UU. en 2004 a 39,6 mil millones de dólares de EE.UU. en 2007. Aunque nuevos fármacos antitumorales salen cada año en el mundo, hasta ahora, todavía no hay medios eficaces para que los seres humanos luchan contra el cáncer. Al mismo tiempo, se descubren constantemente nuevos tipos de cáncer y la aparición y mejora de la resistencia al tumor/resistencia al fármaco hace más y más urgente la necesidad de encontrar nuevos fármacos anticancerosos eficaces.

La solicitud de patente europea número EP3607952A1 describe el uso de carrimicina y sales farmacéuticamente aceptables de la misma para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores. La publicación de patente PCT número WO2007/144876A1 describe el uso de un antibiótico macrólido para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer particular. La solicitud de patente europea número EP2578596A1 describe la preparación, uso y composiciones farmacéuticas o levocarrimicina. La solicitud de patente china número CN101785778A describe la separación de un antibiótico que comprende isovaleril-espiramicina I y la aplicación del antibiótico en enfermedades infecciosas resistentes.

La carrimicina es un nuevo tipo de antibiótico con la 4"-isovaleril espiramicina como un componente principal y la carrimicina se forma clonando la 4"-o-aciltransferasa de la cepa productora de carbomicina en una cepa productora de espiramicina mediante una tecnología transgénica, acilando direccionalmente la espiramicina 4"-OH, y añadiendo una cadena lateral de isovalerilo en la posición 4".

La carrimicina está compuesta por una diversidad de derivados de espiramicina teniendo el componente activo principal de isovaleril espiramicina (I+II+III) un contenido total de no menos del 60 % y es una composición farmacéutica farmacéuticamente aceptable. La estructura central del componente principal de la carrimicina es un anillo de lactona de 16 miembros y anillo de lactona de 16 miembros enlaza una molécula de forosamina, una molécula de micaminosa y una molécula de micarosa. Su componente principal isovaleril espiramicina I, II, III difiere de la estructura de espiramicina en que el grupo conectado a la posición 4' de la micarosa es isovalerilo en lugar de hidroxilo. El fármaco está declarado conjuntamente por el Tonglian Shengyang Group como el tipo 1.1 de nuevo fármaco.

La estructura química del componente principal de carrimicina se muestra como en una fórmula (I):



Fórmula (I)

5 En donde, cuando $R=H$, $R'=\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, el componente principal es isovaleril espiramicina I;

Cuando $R=\text{COCH}_3$, $R'=\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, el componente principal es isovaleril espiramicina II;

10 Cuando $R=\text{COCH}_2\text{CH}_3$, $R'=\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, el componente principal es isovaleril espiramicina III;

La carrimicina pertenece a antibióticos macrólidos de 16 miembros, tiene grupos activos tales como un grupo carboxilo, un grupo alcoxi, un grupo epoxi, un grupo cetona y un grupo aldehído y un par de $\text{C}=\text{C}$ conjugados y tiene un peso molecular de aproximadamente 884 a 982. La carrimicina y los antibióticos macrólidos tienen muchas características comunes debido a sus estructuras químicas similares: son fácilmente solubles en la mayoría de disolventes orgánicos tales como ésteres, acetona, cloroformo, alcoholes, etc., ligeramente solubles en éter de petróleo e insolubles en agua. Debido a la presencia de dos grupos dimetilamina en la estructura molecular, la carrimicina tiene alcalinidad y es fácilmente soluble en una solución acuosa ácida. La carrimicina tiene una propiedad de "solubilidad negativa" en la cual la solubilidad disminuye con un aumento de temperatura. Ya que la isovaleril espiramicina, el componente principal de la carrimicina, tiene una cadena de carbono más larga en la posición 4" y una mala hidrofiliadad, la solubilidad de la carrimicina en agua es menor que la de la espiramicina y la 4"-acetilpiramicina.

La carrimicina es un polvo amorfo blanco con una higroscopicidad ligera y una rotación específica de aproximadamente $-80,8^\circ$, longitud de onda de absorción ultravioleta máxima de 231 - 232 nm. La carrimicina contiene cromóforos fluorescentes débiles, presenta una reacción púrpura que produce una fuerte fluorescencia púrpura en el caso de ácido sulfúrico concentrado o ácido clorhídrico y tiene una absorbancia máxima en 231 - 232 nm.

El fármaco tiene buena lipofilia, capacidad de penetración tisular fuerte, absorción oral rápida, tiempo de mantenimiento del cuerpo largo y efectos prolongados postantibióticos. De acuerdo con una relación entre la farmacodinámica y la conformación química, después de la acilación de antibióticos macrólidos de la posición 4", los antibióticos macrólidos tienen una lipofilia y actividad *in vivo* mejoradas y una actividad antibacteriana *in vivo* significativamente mejorada y efectos terapéuticos clínicos, y la estabilidad *in vivo* de los antibióticos mejora con el crecimiento de la cadena de carbono del 4"-hidroxi éster, es decir, isovaleril espiramicina > butiril espiramicina > propionil-espiramicina > acetilpiramicina.

Los ensayos farmacodinámicos *in vitro* e *in vivo* preliminares mostraron que el fármaco no solo tiene buena actividad antibacteriana contra la mayoría de bacterias G^+ , sino que también tienen ciertos efectos en algunas bacterias G^- y sus indicadores técnicos son obviamente superiores a los de la azitromicina, eritromicina, acetil espiramicina y medamicina. Tiene la actividad antimicrobiana más fuerte, especialmente contra *Mycoplasma pneumoniae*, también tiene cierta actividad antimicrobiana contra las bacterias resistentes a eritromicina, *Gonococcus*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus influenzae*, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis*, *Legionella*, bacilo multilínea y *Clostridium perfringens* y una pequeña resistencia cruzada contra *Staphylococcus aureus* con resistencia clínica a la eritromicina. La carrimicina se usará principalmente para tratar infecciones grampositivas, especialmente infecciones del tracto respiratorio superior, y puede usarse para infecciones del tracto urinario.

En un estudio reciente, el solicitante descubrió que a través de la evaluación de isovaleril espiramicina I, II y/o III contra la actividad antiproliferativa *in vitro* de células de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231, células de hepatoma humano HepG2 o células de hepatoma murinas H_{22} , células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, células de cáncer de pulmón de Lewis, células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 y H1299, célula de adenocarcinoma de células claras renales humano 786-O, célula de adenocarcinoma de células renales humano 769-P, célula de glioma humano U251, célula de glioblastoma humano A172, célula de linfoma de tejido humano U937, células de cáncer de cuello uterino humano HeLa, célula de cáncer de próstata humano PC3, célula de cáncer pancreático humano PANC1, células de cáncer esofágico humano TE-1, célula de adenocarcinoma

gástrico humano SGC7901, célula de cáncer de colon humano HT-29, célula de leucemia promielocítica humana HL-60, célula de cáncer de tiroides humano TPC-1 y célula de cáncer de vejiga humano T-24, las muestras mostraron una buena actividad antiproliferativa contra las células probadas, lo que indica que se espera que isovaleril espiramicina I, II y/o III sea un nuevo fármaco para tratar tumores, completando así la presente descripción.

5

Resumen

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier información proporcionada en la presente descripción y que esté fuera del alcance de la invención se proporciona únicamente con fines informativos.

10

El problema técnico a resolver por la presente descripción es superar los defectos de la técnica anterior y proporcionar el uso de isovaleril espiramicina I o III en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir un tumor.

15 Para resolver el problema técnico anterior, la presente descripción adopta la siguiente solución técnica:

La presente descripción proporciona en primer lugar el uso de isovaleril espiramicina I o III en la fabricación del medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un tumor.

20 El tumor incluye tumor sólido y tumor no sólido.

Además, el tumor sólido incluye tumor sólido benigno y tumor sólido maligno; el tumor no sólido es linfoma o leucemia.

25 Además, el tumor sólido maligno es cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer renal, tumor cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga o tumor maligno de piel;

Preferiblemente, el tumor cerebral es glioma o meningioma y el cáncer gástrico es adenocarcinoma gástrico.

30

La presente descripción muestra mediante experimentos que la isovaleril espiramicina I, II y/o III muestran buena actividad antiproliferativa sobre células de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231, células de hepatoma humano HepG2, células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 y H1299, célula de adenocarcinoma de células claras renales humano 786-O, célula de adenocarcinoma de células renales humano 769-P, célula de linfoma de tejido humano U937, células de cáncer de cuello uterino humano HeLa, célula de cáncer de próstata humano PC3, célula de glioma humano U251, célula de glioblastoma humano A172, célula de cáncer pancreático humano PANC1, célula de cáncer de colon humano HT-29, células de cáncer esofágico humano TE-1, célula de adenocarcinoma gástrico humano SGC7901, célula de leucemia promielocítica humana HL-60, célula de cáncer de tiroides humano TPC-1 y célula de cáncer de vejiga humano T-24, confirmando que isovaleril espiramicina I, II y/o III pueden usarse para el tratamiento de estos tumores o enfermedades cancerosas.

40

Además, el medicamento está en diversas formulaciones hechas de isovaleril espiramicina I o III y sales farmacéuticamente aceptables de isovaleril espiramicina I o III y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

45

Además, el medicamento está en diversas formulaciones hechas de isovaleril espiramicina I o III y las sales farmacéuticamente aceptables de isovaleril espiramicina I o III y fármacos antitumorales y los adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

50 En la presente descripción, la isovaleril espiramicina I o III y al menos uno de los fármacos antitumorales puede formularse en una preparación de compuesto.

Además, cuando se prepara la preparación del compuesto, la relación de dosificación de isovaleril espiramicina I o III a un segundo componente activo es 1-99: 99-1, preferiblemente 5-95:95-5, más preferiblemente 10-90:90-10, además preferiblemente 20-80:80-20.

55

Además, el medicamento es una combinación de un primer agente y un segundo agente, el primer agente contiene isovaleril espiramicina I o III y las sales farmacéuticamente aceptables de isovaleril espiramicina I o III y el segundo agente contiene un fármaco antitumoral.

60

En la presente descripción, el primer agente que contiene el componente activo isovaleril espiramicina I o III puede usarse junto con el segundo agente que contiene uno o más de un fármaco seleccionado de un grupo que contiene un fármaco de quimioterapia, un fármaco de radioterapia, un fármaco de terapia dirigida o un fármaco inmunoterapéutico. Cuando se usan en combinación, el primer agente y el segundo agente pueden administrarse sin ningún orden particular, es decir, el primer agente puede usarse primero, o el segundo agente puede usarse primero, o ambos se usan simultáneamente.

65

Cuando se usan en combinación, la relación de dosificación del primer agente al segundo agente es 1-99: 99-1, preferiblemente 5-95:95-5, más preferiblemente 10-90:90-10, además preferiblemente 20-80:80-20.

5 Además, el fármaco antitumoral es un fármaco de quimioterapia, un fármaco de radioterapia, un fármaco de terapia dirigida y/o un fármaco inmunoterapéutico.

La presente descripción también proporciona un medicamento para tratar y/o prevenir el tumor, el componente activo del medicamento incluye isovaleril espiramicina I o III.

10

Además, el medicamento también incluye un segundo componente activo.

Además, el segundo componente activo incluye uno o más de un fármaco seleccionado de un grupo que contiene un fármaco de quimioterapia, un fármaco de radioterapia, un fármaco de terapia dirigida y un fármaco inmunoterapéutico.

15

La presente descripción también proporciona un producto de combinación para tratar y/o prevenir el tumor, el producto de combinación incluye un primer agente y un segundo agente y el componente activo del primer agente es isovaleril espiramicina I o III y el segundo agente incluye uno o más de un fármaco seleccionado de un grupo que contiene un fármaco de quimioterapia, un fármaco de radioterapia, un fármaco de terapia dirigida y un fármaco inmunoterapéutico.

20

Además, el medicamento o el primer agente es una formulación farmacéuticamente aceptable. Además, una dosis de isovaleril espiramicina I o III en el medicamento o el primer agente está en un intervalo de 5 a 1.500 mg; preferiblemente en un intervalo de 50 a 1.000 mg; más preferiblemente en un intervalo de 100 a 400 mg.

25

En la presente descripción, se puede separar y preparar isovaleril espiramicina I de acuerdo con los métodos de la técnica anterior, tales como se puede separar y preparar la isovaleril espiramicina I de acuerdo con un método del Ejemplo 1 en el documento CN101785778A. Se puede separar y preparar isovaleril espiramicina II de acuerdo con los métodos de la técnica anterior, tales como se puede separar y preparar la isovaleril espiramicina II de acuerdo con un método del Ejemplo 1 en el documento CN101785779A. Se puede separar y preparar isovaleril espiramicina III de acuerdo con los métodos de la técnica anterior, tales como se puede separar y preparar la isovaleril espiramicina III de acuerdo con un método del Ejemplo 1 en el documento CN101773510A.

30

Después de adoptar la solución técnica anterior, la descripción tiene los siguientes efectos beneficiosos en comparación con la técnica anterior:

35

La presente descripción muestra que la isovaleril espiramicina I o III tienen buenos efectos antitumorales, especialmente tienen buenos efectos curativos en tumores incluyendo cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de colon o leucemia. La presente descripción no solo proporciona una base teórica para la aplicación y la promoción clínica de isovaleril espiramicina I o III en la preparación de fármacos para tratar y/o prevenir el tumor, sino que también tiene importantes beneficios económicos y sociales.

40

45 Descripción detallada de las realizaciones

Para hacer más claros los objetivos, las soluciones técnicas y las ventajas de las realizaciones de la presente descripción, a continuación se proporcionará una descripción clara y completa de las soluciones técnicas en las presentes realizaciones. Las siguientes realizaciones se usan para ilustrar la presente descripción, pero no para limitar el alcance de protección de la presente descripción.

50

Realización 1 Comprimidos de isovaleril espiramicina I

Especificación: 200 mg/350 mg

Prescripción del núcleo del comprimido:

Isovaleril espiramicina I	200 g
Celulosa microcristalina	110 g
Carboximetil almidón sódico	22 g
Povidona K30 (5 %)	15 g
Estearato de magnesio	3 g
<hr/>	
Se preparó en	1.000 comprimidos

Prescripción de líquido de recubrimiento:

Opadry II	21 g
-----------	------

ES 2 912 734 T3

Agua destilada	cantidad apropiada
Se preparó en	105 ml

Proceso de preparación:

- 5 Preparación del núcleo de comprimido: el fármaco principal y los adyuvantes se hicieron pasar respectivamente a través de un tamiz de malla 100 y una cantidad de prescripción de isovaleril espiramicina I, una cantidad de prescripción de celulosa microcristalina y 1/2 de cantidad de prescripción de carboximetil almidón sódico se mezclaron uniformemente y a continuación se añadió una solución acuosa de povidona K₃₀ al 5 % para fabricar un material blando. Se usó un tamiz de malla 18 para la granulación, y los gránulos húmedos se secaron en una
- 10 condición ventilada a 60 °C durante 2 horas. Después de los gránulos húmedos, se usó un tamiz de malla 18 para dispersar los gránulos y a continuación se añadió una cantidad de prescripción 1/2 de carboximetil almidón sódico y cantidad de prescripción de estearato de magnesio. Y después de mezclar uniformemente los materiales, la mezcla se comprimió con una matriz de estampación cóncava poco profunda que tenía un diámetro de 11 mm para obtener un núcleo de comprimido que contiene fármacos, en donde el comprimido tiene 350 mg de peso y 6,5 kg de dureza.
- 15 Preparación del líquido de recubrimiento: se pesó el Opadry II requerido (blanco), se añadió la cantidad requerida de agua a un recipiente de preparación de líquido, el Opadry II se añadió al recipiente de preparación de líquido en lotes. Después de añadir todo el Opadry II, la velocidad de agitación se redujo para hacer desaparecer la espiral y después se continuó la agitación durante 30 min para obtener el líquido de recubrimiento.
- 20 Preparación de comprimidos recubiertos con película fina: el núcleo del comprimido se colocó en una bandeja de recubrimiento, se determinaron las condiciones de recubrimiento y se llevó a cabo el recubrimiento con la velocidad del huésped de 20 r/min, la temperatura del aire de entrada de 40 °C, la temperatura del aire de salida de 30 °C, la presión de pulverización de 0,02 MPa y el caudal de la suspensión de pulverización de 1 ml/min. Y después de lograr un estado
- 25 constante, el recubrimiento se pulverizó continuamente durante 1,5 horas hasta que las superficies de los comprimidos fueron lisas y uniformes en color, en donde se calificaron los comprimidos que estaban en cumplimiento con el estándar de inspección de los recubrimientos de película. El recubrimiento gana aproximadamente el 5 % en peso.

Realización 2 Comprimidos de isovaleril espiramicina I (calculado para 10.000 comprimidos)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina I	1000 g
Hidroxiopropilcelulosa de baja sustitución (5 %)	92,5 g
Carboximetil almidón sódico (3 %)	55,5 g
Estearato de magnesio (1 %)	18,5 g
Almidón	Peso total menos el peso de otros materiales brutos y auxiliares
Peso total	1.850 g

- 30 Proceso de preparación: se pesó una cantidad apropiada de almidón, se diluyó a una concentración del 15 % y se calentó a una pasta para obtener un aglutinante; el material principal isovaleril espiramicina I y los adyuvantes almidón, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetil almidón sódico y estearato de magnesio pasan a través de un tamiz de malla 100, respectivamente, y el material principal requerido y los adyuvantes se pesaron de
- 35 acuerdo con la cantidad de prescripción. Después de que la isovaleril espiramicina I, almidón e hidroxipropilcelulosa de baja sustitución se mezclaran completa y uniformemente, la pasta de almidón con una concentración de almidón del 15 % se usó para preparar la mezcla en un material blando que se granuló mediante un tamiz de malla 14 y los gránulos se secaron a 50-60 °C para controlar que un contenido de agua estuviera en el 3-5 %. Se usó un tamiz de malla 14 para dispersar los gránulos y a continuación se añadieron carboximetil almidón sódico y estearato de
- 40 magnesio y se midió el contenido de los gránulos. El peso del comprimido se calculó de acuerdo con el contenido de los gránulos y la mezcla se sometió a formación de comprimidos (con un punzón cóncavo poco profundo Φ9), después la diferencia en el peso de los comprimidos se detectó. Después de pasar la prueba, se envasaron los comprimidos.
- 45 Realización 3 Cápsulas de isovaleril espiramicina I (calculado para 10.000 gránulos)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina I	1.000 g
Almidón	1.080 g menos el peso de polvo bruto de isovaleril espiramicina I
Cápsula medicinal N.º 3	1.000 gránulos
Parafina líquida	50 ml

ES 2 912 734 T3

5 Proceso de preparación: el material principal isovaleril espiramicina I y el almidón medicinal adyuvante se pesaron por separado de acuerdo con la cantidad de fórmula de proceso y después se mezclaron completamente en un mezclador durante 1,5- 2 horas. Los datos obtenidos por muestreo y prueba de contenido deberían ser básicamente consistentes con los datos teóricos (el peso de cada cápsula era aproximadamente 0,105 g) y la cápsula medicinal N.º 3 cualificada y las materias primas mixtas a cargar se rellenaron en un dispositivo de carga de acuerdo con los requisitos de operación de una máquina de cápsulas automática y las cápsulas rellenas se sometieron a una prueba de diferencia ($\pm 10\%$ o menos, <0,3 g) para ver si la velocidad de disolución cumple con los requisitos o no, las cápsulas que cumplen los requisitos después de someterse a ensayo se colocaron en una máquina de pulido para su pulido durante 15-20 minutos con la parafina líquida añadida y después se sacaron para someterse a ensayo mediante cajas de envasado de productos terminados.

10 Realización 4 Jarabe seco de isovaleril espiramicina I (calculado de acuerdo con 10.000 bolsas).

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina I	1.250 g
Ácido cítrico (0,5 %)	15 g
Sacarosa	peso total menos el peso de otros materiales brutos y auxiliares
Peso total	aproximadamente 500 g
Pigmento (curcumina)	aproximadamente 1 g

15 Proceso de preparación: el polvo bruto de isovaleril espiramicina I, ácido cítrico y sacarosa se molieron respectivamente en gránulos mediante un molino de chorro de alta velocidad y el 85 % de los gránulos pasan a través de un tamiz de malla 300, el 15 % de los gránulos pasan a través de un tamiz de malla 180. Después, el polvo fino después de la molienda se pesó de acuerdo con la cantidad de prescripción y se mezcló completamente durante 1-1,5 horas, se midió el contenido, se calculó la capacidad de carga (la capacidad de carga teórica es 500 mg por bolsa). Después, la mezcla se introdujo en una máquina de embolsado, se instaló papel de aluminio y se llevó a cabo el relleno de acuerdo con los requisitos de operación de una máquina de relleno. Se permitió que la diferencia estuviera dentro de $\pm 5\%$ y, después del relleno, se llevó a cabo el envasado exterior después de pasar la inspección.

20 Realización 5 Gránulos de isovaleril espiramicina I (calculado de acuerdo con 10.000 bolsas)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina I	1.250 g
Azúcar en polvo	20.000 g
Dextrina	9.000 g
PVP-K ₃₀ al 5 %	cantidad apropiada

30 Proceso de preparación: el polvo bruto de isovaleril espiramicina I, azúcar en polvo y dextrina se hicieron pasar a través de un tamiz de malla 120 y la isovaleril espiramicina I, azúcar en polvo y dextrina se pesaron de acuerdo con la cantidad de prescripción y se mezclaron uniformemente. Y los materiales uniformemente mezclados anteriores se transformaron en un material blando con un mucílago de PVP-K₃₀ al 5 % y después el material blando se granuló con una máquina de granulación oscilante, se secó a 70 °C y se sometió a dispersión de gránulos y los gránulos resultantes se subempaquetaron después de ser calificados para la inspección.

35 Realización 6 Inyección de polvo liofilizado de isovaleril espiramicina I Se mezclaron uniformemente 500 mg de polvo bruto de isovaleril espiramicina I con una cantidad equimolar de ácido adípico y la mezcla se disolvió en 5 ml de agua para obtener una solución transparente amarilla débil que tiene un pH entre 4,6 y 5,6. Además, se añadieron 40 mg de manitol como un propulsor liofilizado en la solución transparente amarilla débil y, después de congelarse rápidamente a una baja temperatura durante 9 horas, el material se liofilizó para obtener una masa suelta amarilla débil, que se disolvió en 10 ml de agua estéril antes de usarse.

40 Realización 7 Comprimidos de isovaleril espiramicina II

Especificación: 200 mg/350 mg

Prescripción del núcleo del comprimido:

Isovaleril espiramicina II	200 g
Celulosa microcristalina	110 g
Carboximetil almidón sódico	22 g
Povidona K ₃₀ (5 %)	15 g

ES 2 912 734 T3

Estearato de magnesio	3 g
Se preparó en	1.000 comprimidos
Prescripción de líquido de recubrimiento:	
Opadry II	21 g
Agua destilada	cantidad apropiada
Se preparó en	105 ml

Proceso de preparación:

5 Preparación del núcleo de comprimido: el fármaco principal y los adyuvantes se hicieron pasar respectivamente a través de un tamiz de malla 100 y una cantidad de prescripción de isovaleril espiramicina II, una cantidad de prescripción de celulosa microcristalina y 1/2 de cantidad de prescripción de carboximetil almidón sódico se mezclaron uniformemente y a continuación se añadió una solución acuosa de povidona K₃₀ al 5 % para fabricar un material blando. Se usó un tamiz de malla 18 para la granulación, y los gránulos húmedos se secaron en una condición ventilada a 60 °C durante 2 horas. Después de que se secaron los gránulos húmedos, se usó un tamiz de malla 18 para dispersar los gránulos y a continuación se añadió una cantidad de prescripción 1/2 de carboximetil almidón sódico y cantidad de prescripción de estearato de magnesio. Y después de mezclar uniformemente los materiales, la mezcla se comprimó con una matriz de estampación cóncava poco profunda que tenía un diámetro de 11 mm para obtener un núcleo de comprimido que contiene fármacos, en donde el comprimido tiene 350 mg de peso y 6,5 kg de dureza.

15 Preparación del líquido de recubrimiento: se pesó el Opadry II requerido (blanco), se añadió la cantidad requerida de agua a un recipiente de preparación de líquido, el Opadry II se añadió al recipiente de preparación de líquido en lotes. Después de añadir todo el Opadry II, la velocidad de agitación se redujo para hacer desaparecer la espiral y después se continuó la agitación durante 30 min para obtener el líquido de recubrimiento.

20 Preparación de comprimidos recubiertos con película fina: el núcleo del comprimido se colocó en una bandeja de recubrimiento, se determinaron las condiciones de recubrimiento y se llevó a cabo el recubrimiento con la velocidad del huésped de 20 r/min, la temperatura del aire de entrada de 40 °C, la temperatura del aire de salida de 30 °C, la presión de pulverización de 0,02 MPa y el caudal de la suspensión de pulverización de 1 ml/min. Y después de lograr un estado constante, el recubrimiento se pulverizó continuamente durante 1,5 horas hasta que las superficies de los comprimidos fueron lisas y uniformes en color, en donde se calificaron los comprimidos que estaban en cumplimiento con el estándar de inspección de los recubrimientos de película. El recubrimiento gana aproximadamente el 5 % en peso.

30 Realización 8 (no forma parte de la invención)

Comprimidos de isovaleril espiramicina II (calculado para 10.000 comprimidos)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina II	1000 g
Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (5 %)	92,5 g
Carboximetil almidón sódico (3 %)	55,5 g
Estearato de magnesio (1 %)	18,5 g
Almidón	Peso total menos el peso de otros materiales brutos y auxiliares
Peso total	1.850 g

35 Proceso de preparación: se pesó una cantidad apropiada de almidón, se diluyó a una concentración del 15 % y se calentó a una pasta para producir un aglutinante. El material principal isovaleril espiramicina II y los adyuvantes almidón, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetil almidón sódico y estearato de magnesio se hicieron pasar a través de un tamiz de malla 100, respectivamente, y el material principal requerido y los adyuvantes se pesaron de acuerdo con la cantidad de prescripción. Después de que la isovaleril espiramicina II, almidón e hidroxipropilcelulosa de baja sustitución se mezclaran completa y uniformemente, la pasta de almidón con una concentración de almidón del 40 15 % se usó para preparar la mezcla en un material blando que se granuló mediante un tamiz de malla 14 y los gránulos se secaron a 50-60 °C para controlar que un contenido de agua estuviera en el 3-5 %. Se usó un tamiz de malla 14 para dispersar los gránulos y a continuación se añadieron carboximetil almidón sódico y estearato de magnesio y se midió el contenido de los gránulos. El peso del comprimido se calculó de acuerdo con el contenido de los gránulos y la mezcla se sometió a formación de comprimidos (con un punzón cóncavo poco profundo Φ9), después 45 la diferencia en el peso de los comprimidos se detectó. Después de pasar la prueba, se envasaron los comprimidos.

ES 2 912 734 T3

Realización 9 (no forma parte de la invención)

Cápsulas de isovaleril espiramicina II (calculado para 10.000 gránulos)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina II	1.000 g
Almidón	1.080 g menos el peso de polvo bruto de isovaleril espiramicina II
Cápsula medicinal N.º 3	1.000 gránulos
Parafina líquida	50 ml

5 Proceso de preparación: el material principal isovaleril espiramicina II y el almidón medicinal adyuvante se pesaron por separado de acuerdo con la cantidad de fórmula de proceso y después se mezclaron completamente en un mezclador durante 1,5- 2 horas. Los datos obtenidos por muestreo y prueba de contenido deberían ser básicamente consistentes con los datos teóricos (el peso de cada cápsula era aproximadamente 0,105 g) y la cápsula medicinal N.º 3 cualificada y las materias primas mixtas a cargar se rellenaron en un dispositivo de carga de acuerdo con los requisitos de operación de una máquina de cápsulas automática y las cápsulas rellenas se sometieron a una prueba de diferencia ($\pm 10\%$ o menos, <0,3 g) para ver si la velocidad de disolución cumple con los requisitos o no, las cápsulas que cumplen los requisitos después de someterse a ensayo se colocaron en una máquina de pulido para su pulido durante 15-20 minutos con la parafina líquida añadida y después se sacaron para someterse a ensayo mediante cajas de envasado de productos terminados.

15 Realización 10 (no forma parte de la invención) jarabe seco de isovaleril espiramicina II (calculado de acuerdo con 10.000 bolsas)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina II	1.250 g
Ácido cítrico (0,5 %)	15 g
Sacarosa	peso total menos el peso de otros materiales brutos y auxiliares
Peso total	aproximadamente 500 g
Pigmento (curcumina)	aproximadamente 1 g

20 Proceso de preparación: el polvo bruto de isovaleril espiramicina II, ácido cítrico y sacarosa se molieron respectivamente en gránulos mediante un molino de chorro de alta velocidad y el 85 % de los gránulos pasan a través de un tamiz de malla 300, el 15 % de los gránulos pasan a través de un tamiz de malla 180. Después, el polvo fino después de la molienda se pesó de acuerdo con la cantidad de prescripción y se mezcló completamente durante 1-1,5 horas, se midió el contenido, se calculó la capacidad de carga (la capacidad de carga teórica fue 500 mg por bolsa). Después, la mezcla se introdujo en una máquina de embolsado, se instaló papel de aluminio y se llevó a cabo el relleno de acuerdo con los requisitos de operación de una máquina de relleno. Se permitió que la diferencia estuviera dentro de $\pm 5\%$ y, después del relleno, se llevó a cabo el envasado exterior después de pasar la inspección.

30 Realización 11 (no forma parte de la invención) gránulos de isovaleril espiramicina II (calculado de acuerdo con 10.000 bolsas)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina II	1.250 g
Azúcar en polvo	20.000 g
Dextrina	9.000 g

35 Proceso de preparación: el polvo bruto de isovaleril espiramicina II, azúcar en polvo y dextrina se hicieron pasar a través de un tamiz de malla 120 y la isovaleril espiramicina II, azúcar en polvo y dextrina se pesaron de acuerdo con la cantidad de prescripción y se mezclaron uniformemente. Los materiales uniformemente mezclados anteriores se transformaron en un material blando con un mucílago de PVP-K₃₀ al 5 % y después el material blando se granuló con una máquina de granulación oscilante, se secó a 70 °C y se sometió a dispersión de gránulos y los gránulos resultantes se subempaquetaron después de ser calificados para la inspección.

40 Realización 12 (no forma parte de la invención) inyección de polvo liofilizado de isovaleril espiramicina II

45 Se pesaron 500 mg de polvo bruto de isovaleril espiramicina II y se mezclaron uniformemente con una cantidad equimolar de ácido adípico y la mezcla se disolvió en 5 ml de agua para obtener una solución transparente amarilla débil que tiene un pH entre 4,6 y 5,6. Además, se añadieron 40 mg de manitol como un propulsor liofilizado en la solución transparente amarilla débil y, después de congelarse rápidamente a una baja temperatura durante 9 horas, el

ES 2 912 734 T3

material se liofilizó para obtener una masa suelta amarilla débil, que se disolvió en 10 ml de agua estéril antes de usarse.

Realización 13 Comprimidos de isovaleril espiramicina III

5

Especificación: 200 mg/350 mg

Prescripción del núcleo del comprimido:

Isovaleril espiramicina III	200 g
Celulosa microcristalina	110 g
Carboximetil almidón sódico	22 g
Povidona K ₃₀ (5 %)	15 g
Estearato de magnesio	3 g
Se preparó en	1.000 comprimidos

Prescripción de líquido de recubrimiento:

Opadry II	21 g
Agua destilada	cantidad apropiada
Se preparó en	105 ml

Proceso de preparación:

10 Preparación del núcleo de comprimido: el fármaco principal y los adyuvantes se hicieron pasar respectivamente a través de un tamiz de malla 100 y una cantidad de prescripción de isovaleril espiramicina III, una cantidad de prescripción de celulosa microcristalina y 1/2 de cantidad de prescripción de carboximetil almidón sódico se mezclaron uniformemente y a continuación se añadió una solución acuosa de povidona K₃₀ al 5 % para fabricar un material blando. Se usó un tamiz de malla 18 para la granulación, y los gránulos húmedos se secaron en una condición ventilada a 60 °C durante 2 horas. Después de que se secaron los gránulos húmedos, se usó un tamiz de malla 18 para dispersar los gránulos y a continuación se añadió una cantidad de prescripción 1/2 de carboximetil almidón sódico y cantidad de prescripción de estearato de magnesio. Y después de mezclar uniformemente los materiales, la mezcla se comprimió en forma de comprimidos con una matriz de estampación cóncava poco profunda que tenía un diámetro de 11 mm para obtener un núcleo de comprimido que contiene fármacos, en donde el comprimido tiene 350 mg de peso y 6,5 kg de dureza.

20 Preparación del líquido de recubrimiento: se pesó el Opadry II requerido (blanco), se añadió la cantidad requerida de agua a un recipiente de preparación de líquido, el Opadry II se añadió al recipiente de preparación de líquido en lotes. Después de añadir todo el Opadry II, la velocidad de agitación se redujo para hacer desaparecer la espiral y después se continuó la agitación durante 30 min para obtener el líquido de recubrimiento.

25 Preparación de comprimidos recubiertos con película fina: el núcleo del comprimido se colocó en una bandeja de recubrimiento, se determinaron las condiciones de recubrimiento y se llevó a cabo el recubrimiento con la velocidad del huésped de 20 r/min, la temperatura del aire de entrada de 40 °C, la temperatura del aire de salida de 30 °C, la presión de pulverización de 0,02 MPa y el caudal de la suspensión de pulverización de 1 ml/min. Y después de lograr un estado constante, el recubrimiento se pulverizó continuamente durante 1,5 horas hasta que las superficies de los comprimidos fueron lisas y uniformes en color, en donde se calificaron los comprimidos que estaban en cumplimiento con el estándar de inspección de los recubrimientos de película. El recubrimiento gana aproximadamente el 5 % en peso.

35 Realización 14 Comprimidos de isovaleril espiramicina III (calculado para 10.000 comprimidos)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina III	1000 g
Hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (5 %)	92,5 g
Carboximetil almidón sódico (3 %)	55,5 g
Estearato de magnesio (1 %)	18,5 g
Almidón	Peso total menos el peso de otros materiales brutos y auxiliares
Peso total	1.850 g

40 Proceso de preparación: se pesó una cantidad apropiada de almidón, se diluyó a una concentración del 15 % y se calentó a una pasta para obtener un aglutinante. El material principal isovaleril espiramicina III y los adyuvantes almidón, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetil almidón sódico y estearato de magnesio se hicieron pasar a través de un tamiz de malla 100, respectivamente, y el material principal requerido y los adyuvantes se pesaron

ES 2 912 734 T3

de acuerdo con la cantidad de prescripción. Después de que la isovaleril espiramicina III, almidón e hidroxipropilcelulosa de baja sustitución se mezclaran completa y uniformemente, la pasta de almidón con una concentración de almidón del 15 % se usó para preparar la mezcla en un material blando que se granuló mediante un tamiz de malla 14 y los gránulos se secaron a 50-60 °C para controlar que un contenido de agua estuviera en el 3-5 %.

5 Se usó un tamiz de malla 14 para dispersar los gránulos y a continuación se añadieron carboximetil almidón sódico y estearato de magnesio y se midió el contenido de los gránulos;. El peso del comprimido se calculó de acuerdo con el contenido de los gránulos y la mezcla se sometió a formación de comprimidos (con un punzón cóncavo poco profundo $\Phi 9$), después la diferencia en el peso de los comprimidos se detectó. Después de pasar la prueba, se envasaron los comprimidos.

10

Realización 15 Cápsulas de isovaleril espiramicina III (calculado para 10.000 gránulos)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina III	1.000 g
Almidón	1.080 g menos el peso de polvo bruto de isovaleril espiramicina III
Cápsula medicinal N.º 3	1.000 gránulos
Parafina líquida	50 ml

15

Proceso de preparación: el material principal isovaleril espiramicina III y el almidón medicinal adyuvante se pesaron por separado de acuerdo con la cantidad de fórmula de proceso y después se mezclaron completamente en un mezclador durante 1,5- 2 horas. Los datos obtenidos por muestreo y prueba de contenido deberían ser básicamente consistentes con los datos teóricos (el peso de cada cápsula era aproximadamente 0,105 g) y la cápsula medicinal N.º 3 cualificada y las materias primas mixtas a cargar se rellenaron en un dispositivo de carga de acuerdo con los requisitos de operación de una máquina de cápsulas automática y las cápsulas rellenas se sometieron a una prueba de diferencia (± 10 % o menos, <0,3 g) para ver si la velocidad de disolución cumple con los requisitos o no, las cápsulas que cumplen los requisitos después de someterse a ensayo se colocaron en una máquina de pulido para su pulido durante 15-20 minutos con la parafina líquida añadida y después se sacaron para someterse a ensayo mediante cajas de envasado de productos terminados.

20

25 Realización 16 Jarabe seco de isovaleril espiramicina III (calculado de acuerdo con 10.000 bolsas)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina III	1.250 g
Ácido cítrico (0,5 %)	15 g
Sacarosa	peso total menos el peso de otros materiales brutos y auxiliares
Peso total	aproximadamente 500 g
Pigmento (curcumina)	aproximadamente 1 g

30

Proceso de preparación: el polvo bruto de isovaleril espiramicina III, ácido cítrico y sacarosa se molieron respectivamente en gránulos mediante un molino de chorro de alta velocidad y el 85 % de los gránulos pasan a través de un tamiz de malla 300, el 15 % de los gránulos pasan a través de un tamiz de malla 180. Y después el polvo fino después de la molienda se pesó de acuerdo con la cantidad de prescripción y se mezcló completamente durante 1-1,5 horas, se midió el contenido, se calculó la capacidad de carga (la capacidad de carga teórica fue 500 mg por bolsa). Después, la mezcla se introdujo en una máquina de embolsado, se instaló papel de aluminio y se llevó a cabo el relleno de acuerdo con los requisitos de operación de una máquina de relleno. Se permitió que la diferencia estuviera dentro de ± 5 % y, después del relleno, se llevó a cabo el envasado exterior después de pasar la inspección.

35

Realización 17 Gránulos de isovaleril espiramicina III (calculado de acuerdo con 10.000 bolsas)

Prescripción:

Polvo bruto de Isovaleril espiramicina III	1.250 g
Azúcar en polvo	20.000 g
Dextrina	9.000 g
PVP-K ₃₀ al 5 %	cantidad apropiada

40

Proceso de preparación: el polvo bruto de isovaleril espiramicina III, azúcar en polvo y dextrina se hicieron pasar a través de un tamiz de malla 120 y la isovaleril espiramicina III, azúcar en polvo y dextrina se pesaron de acuerdo con la cantidad de prescripción y se mezclaron uniformemente. Los materiales uniformemente mezclados anteriores se transformaron en un material blando con un mucílago de PVP-K₃₀ al 5 % y después el material

blando se granuló con una máquina de granulación oscilante, se secó a 70 °C y se sometió a dispersión de gránulos y los gránulos resultantes se subempaquetaron después de ser calificados para la inspección.

Realización 18 Inyección de polvo liofilizado de isovaleril espiramicina III Se mezclaron uniformemente 500 mg de polvo bruto de isovaleril espiramicina III con una cantidad equimolar de ácido adípico y la mezcla se disolvió en 5 ml de agua para obtener una solución transparente amarilla débil que tiene un pH entre 4,6 y 5,6. Además, se añadieron 40 mg de manitol como un propulsor liofilizado en la solución transparente amarilla débil y, después de congelarse rápidamente a una baja temperatura durante 9 horas, el material se liofilizó para obtener una masa suelta amarilla débil, que se disolvió en 10 ml de agua estéril antes de usarse.

Ejemplo de prueba 1 Bioensayo de actividad antitumoral

El fin del ensayo es evaluar la inhibición de la proliferación celular *in vitro* o la actividad citotóxica de una muestra probada.

Cepas celulares:

Células de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231, células de hepatoma humano HepG2, células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 y H1299, célula de adenocarcinoma de células claras renales humano 786-O, célula de adenocarcinoma de células renales humano 769-P, célula de glioma humano U251, célula de glioblastoma humano A172, célula de linfoma de tejido humano U937, células de cáncer de cuello uterino humano HeLa, célula de cáncer de próstata humano PC3, célula de cáncer pancreático humano PANC1, célula de cáncer esofágico humano TE-1, célula de adenocarcinoma gástrico humano SGC-7901, célula de cáncer de colon humano HT-29, célula de leucemia promielocítica humana HL-60, célula de cáncer de tiroides humano TPC-1 y célula de cáncer de vejiga humano T-24.

Reactivos:

Medio RPMI1640, medio MEM, medio DMEM bajo en azúcar, suero de ternera fetal adquirido de Gibco, EE.UU., tripsina, glutamina, penicilina, estreptomina, dimetilsulfóxido (DMSO) y metil-tiazol-tetrazolio (MTT) adquirido de Sigma, EE.UU.

Instrumentos:

Incubadora de dióxido de carbono (Sanyo, Japón), analizador inmunoabsorbente ligado a enzimas (Tecan, Austria), placa de cultivo de 96 pocillos (Coming, EE.UU.), microscopio invertido (Motic, China).

Las etapas de operación son como sigue:

Células adherentes:

MCF-7, MDA-MB-231, HepG2, A549, H460, H1299, 786-O, 769-P, U251, A172, HeLa, PC3, PANC-1, TE-1, SGC7901 y HT-29 eran células tumorales adherentes. Las células tumorales adherentes en la fase de crecimiento logarítmico se seleccionaron y se digirieron con tripsina, después se prepararon en una suspensión celular de 4 a 5×10^4 /ml mediante un medio que contiene suero bovino fetal al 10 %. Y la suspensión celular se inoculó en una placa de cultivo de 96 pocillos y cada pocillo tenía 100 μ l. La placa de cultivo de 96 pocillos se cultivó a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 horas. El grupo experimental se reemplazó con un nuevo medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de la muestra a analizar, concretamente, isovaleril espiramicina I, isovaleril espiramicina II o isovaleril espiramicina III, mientras que el grupo de control se sustituyó por un medio de cultivo que contenía el mismo volumen de disolvente. Cada grupo se configuró con 3 pocillos paralelos que se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 48 horas. Después de la retirada del sobrenadante, los pocillos se lavaron cuidadosamente 3 veces con PBS. Y se añadieron 100 μ l de medio de cultivo recién preparado que contenía MTT 0,5 mg/ml a cada pocillo para incubación continua durante 4 horas a 37 °C. Después de que el sobrenadante se retirara cuidadosamente, se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo y después de mezclar el material durante 10 minutos con un microscilador, se midió el valor de densidad óptica a 492 nm con un lector de microplacas.

Células en suspensión:

U937 y HL-60 eran células en suspensión y se seleccionaron células en una fase de crecimiento logarítmico en una suspensión celular de 2×10^5 /ml mediante un medio de cultivo RPMI 1640 que contiene suero bovino fetal al 10 %. Y la suspensión celular se inoculó en una placa de cultivo de 96 pocillos y cada pocillo tenía 50 μ l y la placa de cultivo de 96 pocillos se cultivó a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 horas. Se añadieron 50 μ l de un medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de las muestras analizadas isovaleril espiramicina I, isovaleril espiramicina II o isovaleril espiramicina III en el grupo experimental, mientras que un medio de cultivo que contenía el mismo volumen de disolvente se añadió en el grupo de control. Cada grupo se configuró con 3 pocillos paralelos que se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 48 h. Y se añadieron 10 μ l de medio recién preparado que contenía MTT 5 mg/ml en cada pocillo para la incubación continua durante 4 horas a 37 °C. Los cristales se disolvieron en 100 μ l de una

ES 2 912 734 T3

solución triple (10 g de SDS, 0,1 ml de HCl 10 M, 5 ml de isobutanol, diluido con agua destilada hasta 100 ml) y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Se midió el valor de densidad óptica a 492 nm con un lector de microplacas.

Evaluación de resultados:

5 La tasa de inhibición del medicamento sobre el crecimiento de células tumorales se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$10 \text{ Tasa de inhibición del crecimiento celular tumoral (\%)} = \frac{[A_{492} \text{ (control negativo)} - A_{492} \text{ (grupo de dosificación)}]}{A_{492} \text{ (control negativo)}} \times 100 \%$$

Y la concentración media inhibitoria (CI₅₀) de la muestra se determina a partir de la misma.

Resultados:

15 Los resultados de evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro* de las muestras seleccionadas de células de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231, células de hepatoma humano HepG2, células de cáncer de pulmón no microcítico humano A549, células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 y H1299, célula de adenocarcinoma de células claras renales humano 786-O, célula de adenocarcinoma de células renales humano 769-P, célula de glioma humano U251, célula de glioblastoma humano A172, célula de linfoma de tejido humano U937, células de cáncer de cuello uterino humano HeLa, célula de cáncer de próstata humano PC3, célula de cáncer pancreático humano PANC1, célula de cáncer esofágico humano TE-1, célula de adenocarcinoma gástrico humano SGC-7901, célula de cáncer de colon humano HT-29, célula de leucemia promielocítica humana HL-60, célula de cáncer de tiroides humano TPC-1 y célula de cáncer de vejiga humano T-24 se muestran en la Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3:

Tabla 1. Inhibición de isovaleril espiramicina I sobre la proliferación de células tumorales

Cepa celular	CI ₅₀ (µg/ml)	Cepa celular	CI ₅₀ (µg/ml)
MCF-7	20,79±1,57	A172	10,24±0,37
MDA-MB-231	18,12±0,61	U937	10,88±0,05
HepG2	17,90±1,74	HeLa	10,31±0,27
A549	19,93±1,66	PC3	9,39±0,85
H460	19,31±0,35	PANC-1	9,96±0,46
H1299	24,03±2,07	TE-1	8,42±1,53
786-O	5,08±0,08	SGC-7901	11,28±1,27
769-P	5,09±0,04	HT-29	17,30±0,52
U251	11,01±0,32	HL-60	16,52±1,26
TPC-1	19,97±1,93	T-24	18,68±0,58

30 Tabla 2. Inhibición de isovaleril espiramicina II sobre la proliferación de células tumorales (para referencia solamente)

Cepa celular	CI ₅₀ (µg/ml)	Cepa celular	CI ₅₀ (µg/ml)
MCF-7	51,14±2,54	A172	33,62±0,57
MDA-MB-231	49,60±0,39	U937	34,92±0,81
HepG2	37,94±1,71	HeLa	33,31±0,40
A549	36,97±2,92	PC3	32,88±0,53
H460	41,16±0,71	PANC-1	31,93±0,12
H1299	42,24±0,44	TE-1	35,59±2,64
786-O	20,18±0,86	SGC-7901	39,14±1,21
769-P	20,61±0,48	HT-29	31,05±3,23

U251	35,35±1,57	HL-60	29,39±1,82
TPC-1	45,37±2,90	T-24	39,85±3,26

Tabla 3. Inhibición de isovaleril espiramicina III sobre la proliferación de células tumorales

Cepa celular	CI ₅₀ (µg/ml)	Cepa celular	CI ₅₀ (µg/ml)
MCF-7	32,44±1,18	A172	16,17±0,54
MDA-MB-231	29,47±0,28	U937	15,59±0,08
HepG2	27,42±3,52	HeLa	15,86±0,62
A549	28,84±1,73	PC3	16,37±0,27
H460	28,80±0,19	PANC-1	13,18±0,23
H1299	32,40±0,41	TE-1	20,19±1,83
786-O	10,52±0,56	SGC-7901	17,26±0,79
769-P	10,75±0,56	HT-29	22,68±2,32
U251	16,46±1,54	HL-60	21,38±1,75
TPC-1	29,72±4,02	T-24	31,23±1,47

- 5 Los resultados disponibles muestran que las muestras de isovaleril espiramicina I, isovaleril espiramicina II e isovaleril espiramicina III muestran una buena actividad antiproliferativa contra las células analizadas.

Ejemplo de prueba 2 Prueba *in vivo*

- 10 1. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

- 15 Se tomaron células H460 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los
- 20 ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 mg/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la
- 25 retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

- 30 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2 / 2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

- 35 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

- 40 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 4 y la Tabla 5).

5 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 20,70 %, el 46,33 % y el 70,11 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 14,22 %, el 34,43 % y el 61,12 %, respectivamente.

10 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 17,41 %, el 23,31 % y el 63,93 %, respectivamente.

15 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 56,56 %, el 49,00 % y el 31,96 %, respectivamente.

20 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 51,97 %, el 46,49 % y el 37,89 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 63,03 %, el 42,54 % y el 35,95 %, respectivamente.

25 No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

30 Tabla 4. Efecto de isovaleril espiramicina I, II (para referencia) y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 en ratones desnudos ($x \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g)(d1)	Peso corporal (g)(d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	20,47±0,41	24,53±1,74	1,72±0,18	-
Ciclofosfamida	30	6/6	20,46±0,54	21,20±0,75	0,50±0,06***	71,08
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	20,67±0,33	22,55±1,90	1,37±0,13**	20,70
	50	6/6	20,45±0,62	23,54±1,18	0,93±0,18***	46,33
	100	6/6	20,58±0,32	23,91±1,34	0,52±0,07***	70,11
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	20,72±0,47	24,10±1,02	1,48±0,24	14,22
	50	6/6	20,58±0,83	22,49±2,46	1,13±0,08**	34,43
	100	6/6	20,61±0,69	24,87±0,74	0,67±0,20***	61,12
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	20,39±0,56	25,09±1,38	1,42±0,26*	17,41
	50	6/6	20,56±0,47	24,94±0,68	1,32±0,25*	23,31
	100	6/6	20,56±0,64	25,07±1,48	0,62±0,26***	63,93

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo modelo

35 Tabla 5. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de células de cáncer de pulmón macrocítico humano H460 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	146,29±28,15	1497,79±178,37	10,51±1,89	
Ciclofosfamida	30	6/6	146,98±27,55	468,49±28,57***	3,24±0,99***	30,86
Isovaleril	25	6/6	148,20±15,93	889,44±343,94**	5,94±2,02**	56,56

espiramicina I	50	6/6	148,51±17,68	753,94±306,82**	5,15±2,25**	49,00
	100	6/6	145,08±19,59	477,54±89,21***	3,36±0,85***	31,96
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	147,44±15,40	804,17±292,57	5,46±1,87	51,97
	50	6/6	146,77±18,26	700,40±143,83**	4,88±1,36**	46,49
	100	6/6	149,76±13,12	604,38±195,98***	3,98±1,10***	37,89
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	140,44±14,04	914,05±279,14**	6,62±2,34*	63,03
	50	6/6	148,59±14,47	666,74±160,61***	4,47±0,94***	42,54
	100	6/6	143,19±17,40	531,56±78,33***	3,78±0,84***	35,95

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 2. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en célula de cáncer de pulmón no microcítico humano H1299 en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

10 Se tomaron células H1299 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

25 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2$; $RTV = \frac{V}{V_0}$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento RTV}}{\text{grupo de control de modelo RTV}} \times 100 \%$.

30 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

35 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

40 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 6 y la Tabla 7).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 22,11 %, el 43,83 % y el 69,95 %, respectivamente.

45 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 17,32 %, el 44,21 % y el 58,37 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 13,11 %, el 49,38 % y el 62,78 %, respectivamente.

50 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 89,42 %, el 49,81 % y el 27,43 %, respectivamente.

5 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 83,01 %, el 46,94 % y el 36,86 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 89,88 %, el 48,11 % y el 32,43 %, respectivamente.

10 No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

15 Tabla 6. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de pulmón microcítico humano H1299 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,85±0,77	27,73±1,52	1,74±0,21	
Ciclofosfamida	30	6/6	21,83±0,33	23,72±2,41	0,38±0,08***	78,00
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,82±0,41	28,49±4,23	1,36±0,33*	22,11
	50	6/6	21,74±1,04	27,99±2,47	0,98±0,27***	43,83
	100	6/6	21,64±0,96	27,62±2,63	0,52±0,21***	69,95
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	21,91±0,85	28,06±2,64	1,44±0,29*	17,32
	50	6/6	21,99±1,18	25,65±5,03	0,97±0,16***	44,21
	100	6/6	21,54±0,88	28,81±1,21	0,73±0,25***	58,37
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,73±0,32	28,91±1,32	1,51±0,30	13,11
	50	6/6	21,82±0,53	27,84±2,73	0,88±0,20***	49,38
	100	6/6	21,77±0,58	27,71±1,48	0,65±0,17***	62,78

*p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

20 Tabla 7. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de pulmón microcítico humano H1299 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm3) (d1)	Volumen tumoral (mm3) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	136,68±18,16	1710±163,11	12,82±2,82	
Ciclofosfamida	30	6/6	135,46±16,48	384,21±106,99	2,91±0,95***	22,72
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	136,07±17,13	1513,14±387,19*	11,46±3,83	89,42
	50	6/6	135,51±20,47	861,71±164,32***	6,39±1,01**	49,81
	100	6/6	137,34±22,95	470,36±21,77***	3,52±0,68***	27,43
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	139,13±12,26	1474,57±104,54	10,64±0,92	83,01
	50	6/6	138,94±20,16	821,57±90,36***	6,02±1,07***	46,94
	100	6/6	136,94±14,60	634,05±180,18***	4,72±1,57***	36,86
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	137,58±14,95	1565,97±277,97	11,52±2,51	89,88
	50	6/6	137,82±17,12	816,87±299,03**	6,17±2,64***	48,11
	100	6/6	137,09±12,95	557,82±209,73***	4,16±1,90***	32,43

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

25 3. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer esofágico humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células TE-1 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiromicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiromicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiromicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2$; $RTV = \frac{V}{V_0}$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento RTV}}{\text{grupo de control de modelo RTV}} \times 100 \%$.

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 8 y la Tabla 9).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina I con dosis bajas, medias y altas son el 30,92 %, el 51,01 % y el 69,71 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina II con dosis bajas, medias y altas son el 24,87 %, el 43,78 % y el 72,48 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina III con dosis bajas, medias y altas son el 22,64 %, el 40,17 % y el 65,46 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiromicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina I con dosis bajas, medias y altas son el 60,55 %, el 40,70 % y el 20,61 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina II con dosis bajas, medias y altas son el 70,32 %, el 50,51 % y el 36,49 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina III con dosis bajas, medias y altas son el 66,52 %, el 50,71 % y el 30,72 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiromicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 8. Efecto de isovaleril espiromicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer esofágico humano TE-1 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	22,67±0,87	20,97±0,97	1,57±0,62	--

Ciclofosfamida	30	6/6	23,18±1,22	20,57±1,14	0,44±0,18**	71,87
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	23,27±1,35	21,75±0,60	1,08±0,24	30,92
	25	6/6	22,98±1,83	21,28±1,04	0,77±0,43*	51,01
	50	6/6	22,52±1,19	22,32±0,52	0,48±0,36**	69,71
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	21,43±1,58	21,97±0,99	1,18±0,60	24,87
	25	6/6	22,93±0,41	22,28±0,66	0,88±0,46	43,78
	50	6/6	22,35±1,07	21,62±0,32	0,43±0,26**	72,48
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	22,52±0,57	21,38±0,37	1,21±0,53	22,64
	25	6/6	21,82±1,34	21,38±0,67	0,94±0,39	40,17
	50	6/6	21,23±1,05	20,70±0,63	0,54±0,22**	65,46

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 Tabla 9. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer esofágico humano TE-1 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	218,70±76,83	2378,49±829,69***	11,89±15,80***	--
Ciclofosfamida	30	6/6	269,96±92,18	886,22±271,22***	4,00±1,91***	30,18
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	408,51±150,80	2690,27±374,79***	5,48±3,80***	60,55
	25	6/6	258,44±104,69	1143,85±402,36**	3,94±2,71**	40,70
	50	6/6	279,56±156,70	626,64±431,35	3,65±1,71	20,61
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	134,33±57,77	1027,37±363,55**	7,92±6,86**	70,32
	25	6/6	195,76±76,95	1075,36±720,20*	6,99±5,39*	50,51
	50	6/6	143,85±16,25	570,92±293,97*	6,97±7,85*	36,49
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	173,45±63,55	1254,78±637,73**	6,03±5,27**	66,52
	25	6/6	206,72±79,72	1140,10±819,08*	5,02±6,81*	50,71
	50	6/6	331,09±208,02	1106,23±865,11	3,60±1,29	30,72

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 4. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en adenocarcinoma gástrico humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

15 Se tomaron células SGC7901 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, 20 grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 mg/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de 25 ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

30 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral

ES 2 912 734 T3

relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V=axb^2/2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y T/C (%) = grupo de tratamiento RTV /grupo de control de modelo $RTV \times 100$ %.

5 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100$ %.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 10 y la Tabla 11).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 31,56 %, el 53,13 % y el 70,78 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 24,44 %, el 41,76 % y el 70,24 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 21,68 %, el 41,13 % y el 63,34 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 61,13 %, el 42,67 % y el 20,23 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 70,48 %, el 51,42 % y el 36,95 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 65,48 %, el 49,44 % y el 30,34 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 10. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de adenocarcinoma gástrico humano SGC7901 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	22,38±0,71	21,08±0,76	1,97±0,61	--
Ciclofosfamida	30	6/6	22,63±1,35	19,85±0,72	0,44±0,41***	72,26
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	22,02±0,76	21,63±0,80	1,07±0,53*	31,56
	25	6/6	22,05±1,55	21,12±0,90	0,74±0,52**	53,13
	50	6/6	22,65±0,95	21,87±0,61	0,46±0,36***	70,78
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	22,45±1,20	21,73±0,98	1,19±0,62	24,44
	25	6/6	22,65±0,81	22,12±0,85	0,91±0,53**	41,76
	50	6/6	22,13±1,35	21,40±0,38	0,47±0,42***	70,24
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	22,68±0,45	21,55±0,63	1,23±0,70	21,68
	25	6/6	21,98±1,37	21,55±0,95	0,92±0,40**	41,13
	50	6/6	21,42±1,10	20,57±0,87	0,58±0,52**	63,34

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo modelo

45

Tabla 11. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de adenocarcinoma gástrico humano SGC7901 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm3) (d1)	Volumen tumoral (mm3) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	212,82±68,03	2373,38±834,85***	11,15±12,27***	--
Ciclofosfamida	30	6/6	252,63±74,57	865,27±422,15*	4,27±2,36*	30,71
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	412,96±157,62	2815,50±770,23***	5,37±3,46***	61,13
	25	6/6	258,63±104,26	1230,76±635,23*	3,98±2,78*	42,67
	50	6/6	279,56±156,70	630,69±458,86	3,64±1,65	20,23
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	134,33±57,77	1029,72±818,01*	7,90±6,97*	70,48
	25	6/6	195,76±76,95	1094,82±687,01*	6,88±5,66*	51,42
	50	6/6	143,85±16,25	577,98±411,47*	6,90±7,37*	36,95
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	186,22±80,26	1326,06±96,10**	5,52±4,03**	65,48
	25	6/6	274,12±83,50	1473,96±798,75**	3,77±6,51**	49,44
	50	6/6	295,39±188,69	974,67±839,14	3,66±1,35	30,34

* $p<0,05$ en comparación con el grupo modelo; ** $p<0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p<0,001$ en comparación con el grupo modelo

5. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer de próstata humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células PC3 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = axb^2/2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento RTV}/\text{grupo de control de modelo RTV} \times 100 \%$.

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}/\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 12 y la Tabla 13).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 33,87 %, el 51,33 % y el 71,01 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 23,49 %, el 40,16 % y el 50,44 %, respectivamente.

5 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 25,44 %, el 40,16 % y el 60,37 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P<0,05$).

10 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 70,43 %, el 49,14 % y el 30,72 %, respectivamente.

15 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 83,04 %, el 60,08 % y el 44,48 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 75,75 %, el 55,02 % y el 34,57 %, respectivamente.

20 No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 12. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de próstata humano PC3 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

25

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,3±1,28	22,27±1,95	1,88±0,75	--
Ciclofosfamida	30	6/6	21,57±0,75	16,43±0,78	0,56±0,17**	70,03
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,17±0,92	22,8±0,93	1,24±0,51	33,87
	50	6/6	21,63±0,98	22,96±0,60	0,91±0,33*	51,33
	100	6/6	20,92±0,58	21,97±0,85	0,55±0,21**	71,01
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	21,78±0,58	21,93±0,85	1,44±0,56	23,49
	50	6/6	20,98±0,8	21,68±0,41	1,13±0,43	40,16
	100	6/6	21,37±0,88	21,52±0,60	0,93±0,27*	50,44
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,3±0,75	21,67±0,73	1,40±0,54	25,43
	50	6/6	21,3±0,76	21,65±0,94	1,12±0,45*	40,16
	100	6/6	21,4±0,69	21,57±0,48	0,75±0,25**	60,37

* $p<0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p<0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p<0,001$ en comparación con el grupo modelo

Tabla 13. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de próstata humano PC3 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

30

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	36,77±41,07	2458,272±93,21	19,56±0,65	--
Ciclofosfamida	30	6/6	155,36±34,96	834,50±135,35**	5,73±2,23**	29,33
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	127,59±6,73	1758,15±412,68	13,78±3,15	70,43
	50	6/6	186,59±39,40	1706,14±347,50	9,61±3,15	49,14
	100	6/6	175,94±12,32	1041,69±247,71*	6,01±1,78**	30,72
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	154,86±4,11	2404,85±672,33	16,24±6,00	83,04
	50	6/6	157,25±38,97	1729,14±128,57	11,75±3,78	60,08
	100	6/6	131,11±22,05	1162,46±495,46	8,70±2,61	44,48

Isovaleril espiramicina III	25	6/6	146,91±6,70	1914,85±729,54	14,82±7,55	75,75
	50	6/6	187,01±50,28	1935,79±228,06	10,76±2,24	55,01
	100	6/6	155,11±7,98	1051,03±272,23*	6,76±1,61**	34,57

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

6. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer de mama humano en modelo de ratones desnudos

5

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células MCF-7 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

10

15

20

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{a \times b^2}{2}$; $RTV = \frac{V}{V_0}$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento}}{\text{grupo de control de modelo}} \times RTV \times 100 \%$.

25

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

30

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

35

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 14 y la Tabla 15).

40

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 31,10 %, el 51,72 % y el 70,12 %, respectivamente.

45

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 20,55 %, el 41,72 % y el 56,81 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 26,75 %, el 39,08 % y el 61,78 %, respectivamente.

50

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

55

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 71,92 %, el 49,05 % y el 30,80 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 79,23 %, el 60,58 % y el 44,44 %, respectivamente.

60

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 75,03 %, el 54,92 % y el 34,91 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

5 Tabla 14. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de mama humano MCF-7 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,8±0,91	21,58±0,84	2,72±0,34	
Ciclofosfamida	30	6/6	22,03±0,70	17,77±0,65	0,81±0,25*8	70,18
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,33±0,79	21,73±0,95	1,87±0,25	31,10
	50	6/6	21,22±0,41	21,48±0,73	1,31±0,50	51,72
	100	6/6	22,25±0,92	21,8±0,78	0,81±0,08**	70,12
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	21,3±0,67	21,78±0,68	2,16±0,51	20,55
	50	6/6	21,1±0,53	21,37±0,67	1,58±0,51	41,72
	100	6/6	21,93±0,62	21,96±0,68	1,17±0,47	56,81
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	20,73±0,97	21,21±0,78	1,99±0,81	26,75
	50	6/6	21,33±0,84	21,2±0,75	1,66±0,66	39,09
	100	6/6	21,53±0,56	21,73±0,69	1,03±0,54*	61,78

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 Tabla 15. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de mama humano MCF-7 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	137,63±12,68	2393,99±69,20	17,50±1,47	
Ciclofosfamida	30	6/6	103,78±12,65	532,62±56,27**	5,17±0,64**	29,56
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	139,97±26,58	1634,85±789,61	12,59±7,49	71,92
	50	6/6	146,57±32,97	1162,80±394,71	8,58±4,41*	49,05
	100	6/6	124,02±15,14	656,95±49,58**	5,39±0,97**	30,80
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	104,64±10,69	1450,36±218,20	13,87±1,53	79,23
	50	6/6	105,81±11,20	1113,42±71,14	10,60±1,10	60,58
	100	6/6	119,69±14,63	914,69±130,26*	7,78±1,71*	44,45
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	137,99±20,99	1758,49±129,06	13,13±3,15	75,03
	50	6/6	109,95±13,42	1043,33±113,01	9,61±1,66	54,92
	100	6/6	113,14±9,02	684,21±115,00**	5,17±0,64**	34,90

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

15 7. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer de mama humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

20 Se tomaron células MDA-MB-231 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró

continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

5 Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

10 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a^2 b$; $RTV = \frac{V}{V_0}$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento RTV}}{\text{grupo de control de modelo RTV}} \times 100 \%$.

15 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

20 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

25 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 16 y la Tabla 17).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 22,84 %, el 55,17 % y el 69,11 %, respectivamente.

30 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 18,17 %, el 29,66 % y el 58,91 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 24,35 %, el 21,01 % y el 62,93 %, respectivamente.

35 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 69,71 %, el 44,18 % y el 27,74 %, respectivamente.

40 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 80,22 %, el 58,78 % y el 30,89 %, respectivamente.

45 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 68,36 %, el 50,12 % y el 35,27 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

50 Tabla 16. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de mama humano MDA-MB-231 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,25±1,34	24,60±1,71	2,32±0,22	-
Ciclofosfamida	30	6/6	21,65±1,50	19,26±1,49	0,38±0,27***	70,54
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,97±1,25	24,25±1,39	1,79±0,34*	22,84
	50	6/6	21,24±1,40	25,56±1,69	1,04±0,44***	55,17
	100	6/6	21,87±1,49	24,47±1,85	0,72±0,48***	69,11
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	20,24±1,89	21,32±1,85	1,90±0,31*	18,17
	50	6/6	20,02±1,78	22,92±1,54	1,63±0,32**	29,66

	100	6/6	21,91±1,97	22,42±1,41	0,95±0,42***	58,91
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,69±1,78	23,97±1,81	1,76±0,20**	24,35
	50	6/6	21,17±1,6	24,36±1,20	1,11±0,54**	52,01
	100	6/6	20,43±2,77	23,53±1,58	0,86±0,44***	62,93

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 Tabla 17. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de mama humano MDA-MB-231 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm3) (d1)	Volumen tumoral (mm3) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	121,07±9,76	1875,22±104,10	15,62±2,08	--
Ciclofosfamida	30	6/6	116,90±7,18	691,84±337,21***	5,89±2,84***	37,73
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	111,07±8,47	1213,38±299,29**	10,89±2,52*	69,71
	50	6/6	116,00±8,13	807,45±319,26***	6,90±2,43***	44,18
	100	6/6	111,91±10,26	458,55±338,74***	4,33±3,47***	27,74
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	119,72±6,52	1493,96±171,49**	12,53±1,78*	80,22
	50	6/6	119,07±3,19	1094,89±291,37***	9,18±2,38***	58,78
	100	6/6	115,89±9,01	700,44±192,38***	6,08±1,74***	30,89
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	114,53±6,52	1217,28±267,06**	10,68±2,47**	68,36
	50	6/6	112,00±10,40	860,48±286,44***	7,83±2,97***	50,12
	100	6/6	115,76±7,04	647,02±338,62***	5,51±2,72***	35,27

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 8. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer pancreático humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

15 Se tomaron células PANC-1 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

30 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = axb^2/2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

35 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un

indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = (1 - el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento/el peso tumoral promedio del grupo modelo) x 100 %.

5 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 18 y la Tabla 19).

10 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 31,10 %, el 51,72 % y el 70,12 %, respectivamente.

15 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 20,55 %, el 41,72 % y el 56,81 %, respectivamente.

20 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 26,75 %, el 39,08 % y el 61,78 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo (P<0,05).

25 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 71,92 %, el 49,05 % y el 30,80 %, respectivamente.

30 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 79,23 %, el 60,58 % y el 44,44 %, respectivamente.

35 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 75,03 %, el 54,92 % y el 34,91 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 18. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer pancreático humano PANC-1 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,8±0,91	21,58±0,84	2,72±0,34	
Ciclofosfamida	30	6/6	22,03±0,70	17,77±0,65	0,81±0,25*8	70,18
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	21,33±0,79	21,73±0,95	1,87±0,25	31,10
	25	6/6	21,22±0,41	21,48±0,73	1,31±0,50	51,72
	50	6/6	22,25±0,92	21,8±0,78	0,81±0,08**	70,12
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	21,3±0,67	21,78±0,68	2,16±0,51	20,55
	25	6/6	21,1±0,53	21,37±0,67	1,58±0,51	41,72
	50	6/6	21,93±0,62	21,96±0,68	1,17±0,47	56,81
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	20,73±0,97	21,21±0,78	1,99±0,81	26,75
	25	6/6	21,33±0,84	21,2±0,75	1,66±0,66	39,09
	50	6/6	21,53±0,56	21,73±0,69	1,03±0,54*	61,78

35 * p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

Tabla 19. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer pancreático humano PANC-1 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

40

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm3) (d1)	Volumen tumoral (mm3) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	137,63±12,68	2393,99±69,20	17,50±1,47	
Ciclofosfamida	30	6/6	103,78±12,65	532,62±56,27**	5,17±0,64**	29,56

Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	139,97±26,58	1634,85±789,61	12,59±7,49	71,92
	25	6/6	146,57±32,97	1162,80±394,71**	8,58±4,41*	49,05
	50	6/6	124,02±15,14	656,95±49,58***	5,39±0,97**	30,80
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	104,64±10,69	1450,36±218,20	13,87±1,53	79,23
	25	6/6	105,81±11,20	1113,42±71,14	10,60±1,10	60,58
	50	6/6	119,69±14,63	914,69±130,26**	7,78±1,71*	44,45
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	137,99±20,99	1758,49±129,06	13,13±3,15	75,03
	25	6/6	109,95±13,42	1043,33±113,01	9,61±1,66	54,92
	50	6/6	113,14±9,02	684,21±115,00**	5,17±0,64**	34,90

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

9. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en hepatoma humano en modelo de ratones desnudos

5

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células HepG-2 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

20

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2 / 2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

30

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 20 y la Tabla 21).

40

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 24,43 %, el 57,93 % y el 68,22 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 21,07 %, el 31,43 % y el 61,56 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 38,92 %, el 60,54 % y el 63,28 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 65,03 %, el 42,12 % y el 27,49 %, respectivamente.

5 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 81,03 %, el 57,02 % y el 39,31 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 64,69 %, el 43,18 % y el 32,71 %, respectivamente.

10 No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 20. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de hepatoma humano HepG-2 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

15

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,21±1,42	23,75±1,71	2,43±0,23	--
Ciclofosfamida	30	6/6	21,89±1,84	19,67±1,49	0,07±0,38***	71,04
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,36±1,67	23,24±1,33	1,84±0,23**	24,43
	50	6/6	21,47±1,58	23,64±1,67	1,02±0,45***	57,93
	100	6/6	21,37±1,36	22,867±1,57	0,77±0,44***	68,22
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	21,98±1,74	23,35±1,83	1,92±0,32*	21,07
	50	6/6	20,75±1,86	22,22±1,62	1,67±0,32**	31,43
	100	6/6	21,48±1,98	22,45±1,28	0,93±0,41***	61,56
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,07±1,24	23,94±1,67	1,48±0,42**	38,92
	50	6/6	21,25±1,86	24,36±1,53	0,96±0,44***	60,54
	100	6/6	20,47±2,24	23,64±1,44	0,89±0,46***	63,28

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

Tabla 21. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de hepatoma humano HepG-2 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

20

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	117,98±9,34	1960,30±92,59	16,74±2,02	--
Ciclofosfamida	30	6/6	119,66±7,65	792,56±287,31***	6,58±2,18***	39,27
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	114,02±11,68	1248,33±337,59**	10,89±2,67**	65,03
	50	6/6	122,31±4,68	851,37±371,80***	7,05±3,35***	42,12
	100	6/6	110,06±9,58	481,16±326,94***	4,60±3,39***	27,49
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	122,82±4,10	1666,11±202,07*	13,57±1,64*	81,03
	50	6/6	118,60±4,30	1127,90±319,12**	9,55±2,84***	57,02
	100	6/6	118,70±7,20	783,73±312,41***	6,58±2,48***	39,31
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	116,67±8,32	1261,48±283,95**	10,83±2,47**	64,69
	50	6/6	119,43±10,86	852,87±293,29***	7,23±2,57***	43,18
	100	6/6	118,26±6,57	641,99±364,25***	5,48±3,19***	32,71

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

25 10. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer de pulmón no microcítico humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células A549 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiromicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiromicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiromicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = axb^2/2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 22 y la Tabla 23).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina I con dosis bajas, medias y altas son el 24,00 %, el 58,10 % y el 69,52 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina II con dosis bajas, medias y altas son el 20,73 %, el 31,87 % y el 60,19 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina III con dosis bajas, medias y altas son el 37,99 %, el 55,95 % y el 66,53 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiromicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina I con dosis bajas, medias y altas son el 67,18 %, el 41,93 % y el 28,35 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina II con dosis bajas, medias y altas son el 83,41 %, el 58,75 % y el 39,42 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina III con dosis bajas, medias y altas son el 65,93 %, el 47,25 % y el 33,04 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiromicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 22. Efecto de isovaleril espiromicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,21±1,34	24,57±1,71	2,39±0,24	-

Ciclofosfamida	30	6/6	21,89±1,22	19,27±1,49	0,70±0,39***	70,59
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,54±1,27	24,20±1,33	1,82±0,19**	24,00
	50	6/6	21,48±1,46	25,56±1,67	1,00±0,44***	58,10
	100	6/6	21,36±1,82	24,47±1,98	0,73±0,45***	69,52
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	20,91±1,07	21,32±1,88	1,90±0,31*	20,73
	50	6/6	20,03±1,88	12,92±1,68	1,63±0,32**	31,87
	100	6/6	21,71±1,94	12,42±1,37	0,95±0,42***	60,19
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,68±1,25	23,97±1,01	1,49±0,42*	37,99
	50	6/6	21,99±1,40	24,36±1,73	1,06±0,49***	55,95
	100	6/6	20,57±2,28	23,53±1,63	0,80±0,43***	66,53

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 Tabla 23. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de pulmón no microcítico humano A549 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	118,12±9,47	1901,00±131,19	16,23±2,25	--
Ciclofosfamida	30	6/6	115,15±10,00	733,89±352,79***	9,47±2,91**	39,73
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	111,89±12,17	1227,24±329,84**	10,91±2,63**	67,18
	50	6/6	119,73±5,73	750,44±220,77***	6,40±1,75***	39,42
	100	6/6	110,27±11,43	475,83±355,37***	4,60±3,69***	28,35
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	119,67±7,25	1614,91±65,26**	13,54±1,07*	83,41
	50	6/6	117,96±4,88	1129,10±326,54**	9,54±2,62***	58,75
	100	6/6	116,96±6,56	917,10±270,86***	7,78±2,03***	47,94
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	113,96±6,85	1216,86±295,20**	10,70±2,64**	65,93
	50	6/6	113,65±11,57	856,65±281,96***	7,67±2,86***	47,25
	100	6/6	118,69±8,13	632,73±350,89***	5,36±3,01***	33,04

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 11. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en glioma humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

15 Se tomaron células U251 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 mg/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

30 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{a \times b^2}{2}$; $RTV =$

V/V_0 (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y T/C (%) = grupo de tratamiento RTV/grupo de control de modelo RTVx100 %.

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

5 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = (1 - el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento/el peso tumoral promedio del grupo modelo) x 100 %.

10 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 24 y la Tabla 25).

15 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 30,94 %, el 44,53 % y el 69,21 %, respectivamente.

20 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 10,91 %, el 15,81 % y el 40,26 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 15,45 %, el 32,74 % y el 59,56 %, respectivamente.

25 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

30 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 76,40 %, el 44,54 % y el 25,80 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 76,14 %, el 51,88 % y el 43,26 %, respectivamente.

35 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 68,16 %, el 54,34 % y el 41,10 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

40 Tabla 24. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de glioma humano U251 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,02±0,37	20,50±0,25	1,38±0,05	--
Ciclofosfamida	30	6/6	20,72±0,48	19,40±1,40	0,42±0,06***	69,31
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,03±0,55	21,09±0,53	0,96±0,08*	30,94
	50	6/6	20,78±0,66	21,08±0,54	0,77±0,09**	44,53
	100	6/6	21,10±0,35	20,86±0,66	0,43±0,01**	69,21
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	20,77±0,65	20,85±0,79	1,23±0,12	10,91
	50	6/6	21,25±0,46	20,86±0,43	1,16±0,10*	15,81
	100	6/6	20,92±0,82	21,47±0,70	0,83±0,12***	40,26
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	20,96±0,58	20,70±0,51	1,17±0,11**	15,45
	50	6/6	21,25±0,53	21,10±0,60	0,93±0,12**	32,74
	100	6/6	21,33±0,62	21,03±0,55	0,56±0,05***	59,56

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo modelo

Tabla 25. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de glioma humano U251 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	125,74±10,43	2082,09±83,17	16,69±2,03	--
Ciclofosfamida	30	6/6	119,00±11,13	504,56±93,91**	4,23±0,95***	62,92
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	122,81±10,35	1550,33±72,99**	12,69±1,08**	76,40
	50	6/6	124,39±10,31	930,42±204,72**	10,67±1,09***	44,54
	100	6/6	124,88±6,57	537,02±93,66***	10,05±0,71***	25,80
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	125,90±11,45	1596,45±267,65*	14,73±1,33*	76,14
	50	6/6	118,33±11,65	1030,10±207,19**	14,31±0,98*	51,88
	100	6/6	122,74±10,75	890,78±225,34**	12,88±1,54**	43,26
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	124,24±10,18	1413,41±221,90*	13,47±1,67**	68,16
	50	6/6	121,24±9,15	1096,57±173,49**	12,63±1,27***	54,34
	100	6/6	120,86±6,34	832,79±182,98**	10,96±0,82***	41,10

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 12. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en glioblastoma humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células A172 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo temozolomida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a^2 b$; $RTV = \frac{V}{V_0}$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{RTV_{\text{grupo de tratamiento}}}{RTV_{\text{grupo de control de modelo}}} \times 100 \%$.

30 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 26 y la Tabla 27).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 30,75 %, el 44,26 % y el 68,79 %, respectivamente.

45 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 10,85 %, el 15,71 % y el 40,01 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 15,35 %, el 32,54 % y el 59,19 %, respectivamente.

5 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 74,49 %, el 43,43 % y el 25,16 %, respectivamente.

10 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 74,24 %, el 50,59 % y el 42,18 %, respectivamente.

15 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 66,45 %, el 52,89 % y el 40,08 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

20 Tabla 26. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de glioblastoma humano A172 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	20,80±0,66	20,50±0,75	1,39±0,05	--
Temozolomida	50	6/6	21,07±0,57	19,83±1,24	0,43±0,06***	68,89
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	21,06±0,43	20,34±0,17	0,96±0,08**	30,75
	25	6/6	20,98±0,73	20,93±0,54	0,77±0,09**	44,26
	50	6/6	21,00±0,65	20,88±0,58	0,43±0,07***	68,79
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	21,36±0,67	21,36±0,87	1,24±0,12	10,85
	25	6/6	21,10±0,62	21,30±0,89	1,17±0,10*	15,71
	50	6/6	21,08±0,74	20,97±0,68	0,84±0,12**	40,01
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	21,54±0,36	20,64±0,54	1,18±0,11*	15,35
	25	6/6	20,98±0,47	21,54±0,72	0,94±0,12**	32,54
	50	6/6	21,59±0,32	20,67±0,56	0,57±0,05***	59,19

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo modelo

25 Tabla 27. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de glioblastoma humano A172 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	123,2±10,22	2040,44±81,50	16,69±2,03	...
Temozolomida	50	6/6	116,6±10,91	482,11±89,74***	4,12±2,03***	61,35
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	120,36±10,15	1519,32±71,53*	12,69±1,08**	74,49
	25	6/6	121,90±10,10	889,01±195,61**	10,67±1,08***	43,43
	50	6/6	122,38±6,44	513,12±89,49***	10,05±0,71***	25,16
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	123,39±11,22	1525,41±255,74*	14,73±1,33*	74,24
	25	6/6	115,96±11,42	984,26±197,97**	14,31±0,98*	50,59
	50	6/6	120,28±10,53	851,14±215,31**	12,88±1,54**	42,18
Isovaleril	12,5	6/6	121,75±9,98	1305,51±212,02*	13,47±1,67**	66,45

espiramicina III	25	6/6	118,81±8,97	1047,77±165,77**	12,63±1,27***	52,89
	50	6/6	118,44±6,21	795,73±174,84***	10,96±0,82***	40,08

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

13. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en linfoma humano en modelo de ratones desnudos

5

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células U937 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

10

15

20

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = axb^2/2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

25

30

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

35

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 28 y la Tabla 29).

40

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 41,73 %, el 50,73 % y el 65,03 %, respectivamente.

45

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 25,61 %, el 35,44 % y el 43,63 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 41,19 %, el 53,03 % y el 61,77 %, respectivamente.

50

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

55

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 68,65 %, el 39,74 % y el 35,25 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 74,19 %, el 52,10 % y el 46,09 %, respectivamente.

60

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 63,36 %, el 49,30 % y el 38,66 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 28. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de linfoma humano U937 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	20,77±0,51	21,11±0,53	1,94±0,27	--
Ciclofosfamida	30	6/6	21,00±0,72	19,72±0,95	0,68±0,12***	65,11
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	21,19±0,66	21,16±0,74	1,13±0,60*	41,73
	25	6/6	21,28±0,52	21,01±0,68	0,95±0,42**	50,73
	50	6/6	20,64±0,39	20,94±0,77	0,68±0,09***	65,03
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	21,10±0,64	20,97±0,74	1,44±0,64	25,61
	25	6/6	21,05±0,30	21,03±0,632	1,25±0,66*	35,44
	50	6/6	20,80±0,51	21,22±0,51	1,09±0,62*	43,63
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	20,84±0,68	20,92±0,63	1,14±0,54*	41,19
	25	6/6	20,91±0,58	20,74±0,352	0,91±0,51**	53,03
	50	6/6	21,16±0,61	21,24±0,50	0,74±0,18***	61,77

5 * p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

Tabla 29. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de linfoma humano U937 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

10

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	115,70±9,96	1986,59±516,10	17,04±4,02	--
Ciclofosfamida	30	6/6	125,00±32,61	722,72±55,32**	6,04±1,26***	35,44
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	108,43±6,49	1270,43±435,28*	11,70±3,59*	68,65
	25	6/6	108,61±9,06	734,22±76,87**	6,77±0,57**	39,74
	50	6/6	109,98±5,88	660,17±37,49**	6,01±2,26**	35,25
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	111,58±23,26	1400,95±558,82	12,64±5,00	74,19
	25	6/6	120,21±24,68	1117,59±565,29*	8,88±2,64**	52,10
	50	6/6	111,50±7,03	885,75±418,53**	7,85±3,27**	46,09
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	119,70±18,30	1314,25±479,76*	10,80±3,02*	63,36
	25	6/6	112,93±27,42	939,79±296,72**	8,40±2,25**	49,30
	50	6/6	112,85±21,90	728,49±51,66**	6,59±0,90**	38,66

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

15

14. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer de cuello uterino humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células HeLa en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

25

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

5 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = a \times b^2 / 2$; $RTV = V / V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

10 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

15 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

20 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 30 y la Tabla 31).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 46,69 %, el 51,57 % y el 65,55 %, respectivamente.

25 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 30,67 %, el 42,90 % y el 43,30 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 39,33 %, el 52,41 % y el 61,68 %, respectivamente.

30 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

35 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 69,18 %, el 39,57 % y el 30,91 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 30,67 %, el 42,90 % y el 43,30 %, respectivamente.

40 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 39,33 %, el 52,41 % y el 61,68 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

45 Tabla 30. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de cuello uterino humano HeLa en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,33±0,48	21,27±0,68	1,93±0,21	--
Ciclofosfamida	30	6/6	21,10±0,69	19,73±1,22	0,66±0,13***	65,74
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	20,72±0,49	21,10±0,68	1,03±0,59*	46,69
	25	6/6	21,07±0,44	21,23±0,73	0,94±0,48**	51,57
	50	6/6	20,82±0,72	20,95±0,45	0,67±0,09***	65,55
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	20,92±0,46	21,16±0,51	1,34±0,60	30,67
	25	6/6	20,87±0,34	21,25±0,55	1,10±0,62*	42,90
	50	6/6	20,77±0,43	21,09±0,36	1,10±0,61*	43,30
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	21,30±0,64	20,67±0,45	1,17±0,64*	39,33
	25	6/6	20,87±0,78	20,80±0,55	0,92±0,49**	52,41

	50	6/6	21,09±0,51	21,10±0,52	0,75±0,11***	61,68
--	----	-----	------------	------------	--------------	-------

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 Tabla 31. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de cuello uterino humano HeLa en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	119,20±11,23	1991,26±516,28	16,58±3,86	-
Ciclofosfamida	30	6/6	127,17±35,82	724,89±53,90**	6,00±1,35***	36,17
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	112,43±6,87	1287,77±552,57*	11,47±4,97	69,18
	25	6/6	112,78±9,72	738,39±75,32**	6,56±0,55**	39,57
	50	6/6	114,15±6,08	588,18±73,34**	5,13±0,68***	30,91
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	115,41±23,27	1301,28±391,77*	11,36±2,90	68,55
	25	6/6	125,04±20,71	1184,42±369,49*	9,30±1,74**	56,07
	50	6/6	111,84±4,83	851,58±93,66**	7,62±0,85**	45,96
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	123,36±21,45	1281,92±242,71*	1,43±1,47**	62,92
	25	6/6	115,2±27,18	1007,46±481,36**	8,63±3,37**	52,05
	50	6/6	113,35±20,84	727,16±46,92**	6,52±0,73**	39,33

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 15. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en adenocarcinoma de células renales claras humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

15 Se tomaron células 786-O en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

30 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = a \times b^2 / 2$; $RTV = V / V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

35 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

40 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento} / \text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 32 y la Tabla 33).

5 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 34,70 %, el 39,22 % y el 64,36 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 19,69 %, el 41,09 % y el 60,00 %, respectivamente.

10 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 35,80 %, el 52,14 % y el 62,49 %, respectivamente.

15 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 37,88 %, el 37,19 % y el 36,89 %, respectivamente.

20 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 76,92 %, el 53,61 % y el 35,74 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 73,13 %, el 51,33 % y el 34,20 %, respectivamente.

25 No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

30 Tabla 32. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de adenocarcinoma de células renales claras humano 786-O en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,83±1,32	24,17±1,29	2,14±0,07	-
Ciclofosfamida	30	6/6	21,58±0,81	19,42±0,67	0,63±0,04***	70,51
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,87±0,89	22,95±0,88	1,40±0,40**	34,70
	50	6/6	22,00±0,94	22,82±0,64	1,31±0,35***	39,22
	100	6/6	21,88±0,54	23,00±0,67	0,76±0,13***	64,36
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	22,05±0,71	23,33±0,54	1,72±0,27**	19,69
	50	6/6	22,42±0,54	23,42±0,50	1,26±0,31**	41,09
	100	6/6	22,33±0,41	23,45±0,91	0,85±0,16***	60,00
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	22,72±0,78	23,85±0,89	1,38±0,42**	35,80
	50	6/6	21,43±1,08	22,33±1,09	1,02±0,27***	52,14
	100	6/6	22,28±1,72	23,43±1,69	0,80±0,05***	62,49

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo modelo

35 Tabla 33. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de adenocarcinoma de células renales claras humano 786-O en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	114,09±9,07	2060,98±168,33	18,06±1,78	--
Ciclofosfamida	30	6/6	108,64±14,40	734,23±24,66***	6,76±0,79***	37,41
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	96,85±9,98	677,21±58,76***	6,99±0,83***	37,88
	50	6/6	96,82±8,52	664,44±73,49***	6,86±1,01***	37,19

	100	6/6	103,25±9,71	702,74±37,66***	6,81±0,31***	36,87
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	96,82±8,52	1415,80±201,11*	14,62±1,93*	76,92
	50	6/6	96,82±8,52	982,68±265,02*	10,19±2,62**	53,61
	100	6/6	103,26±9,71	701,57±127,91**	6,79±1,65***	35,74
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	106,47±6,86	1479,90±458,97*	18,90±3,60	73,13
	50	6/6	96,82±8,52	944,60±112,60**	9,76±1,44**	51,33
	100	6/6	103,26±9,71	635,26±78,22***	6,18±0,61***	34,20

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 16. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en adenocarcinoma de células renales humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

10 Se tomaron células 769-P en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: un grupo modelo, un grupo ciclofosfamida, grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

25 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2 / 2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \text{grupo de tratamiento } RTV / \text{grupo de control de modelo } RTV \times 100 \%$.

30 Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

35 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

40 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 34 y la Tabla 35).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 33,68 %, el 47,33 % y el 68,82 %, respectivamente.

45 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 38,29 %, el 47,61 % y el 61,79 %, respectivamente.

50 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 40,87 %, el 60,50 % y el 64,46 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

55 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 75,78 %, el 57,12 % y el 36,88 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 68,22 %, el 42,64 % y el 34,76 %, respectivamente.

5 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 61,59 %, el 51,59 % y el 35,55 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

10 Tabla 34. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de adenocarcinoma de células renales humano 769-P en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,79±1,17	21,83±1,32	2,06±0,08***	--
Ciclofosfamida	30	6/6	21,61±1,00	21,58±0,81	0,6±0,03***	70,52
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,44±1,45	21,87±0,89	1,37±0,55*	33,68
	50	6/6	21,79±1,37	22,00±0,94	1,09±0,48**	47,33
	100	6/6	21,39±1,24	21,88±0,54	0,64±0,01***	68,82
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	22,17±1,47	22,05±0,71	1,27±0,42**	38,29
	50	6/6	22,07±1,52	22,42±0,54	1,3±0,23***	47,61
	100	6/6	21,96±1,19	22,33±0,41	0,79±0,06***	61,79
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	23,09±1,90	22,72±0,78	1,22±0,46**	40,87
	50	6/6	22,90±1,00	21,43±1,08	0,82±0,06***	60,50
	100	6/6	20,49±1,14	22,28±1,72	0,73±0,08***	64,46

15 * p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

Tabla 35. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de adenocarcinoma de células renales humano 769-P en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	112,53±10,69	2076,78±168,33	18,45±1,79	--
Ciclofosfamida	30	6/6	107,92±15,94	704,00±45,50***	6,52±0,90***	35,34
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	106,47±6,86	1489,03±450,17*	13,99±3,52	75,78
	50	6/6	96,82±8,51	1020,75±282,92*	10,54±2,65*	57,12
	100	6/6	103,26±9,71	702,74±37,66***	6,81±0,30***	36,88
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	162,50±59,24	2045,85±301,35	12,59±5,32	68,22
	50	6/6	193,10±35,41	1519,68±239,38**	7,87±2,29***	42,64
	100	6/6	109,14±10,13	700,14±100,08***	6,42±0,99***	34,76
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	146,32±43,02	1663,32±445,50*	11,37±1,469*	61,59
	50	6/6	180,43±51,70	1717,76±524,33**	9,52±1,67**	51,59
	100	6/6	104,38±12,92	684,88±62,28***	6,56±0,28***	36,55

20 * p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

17. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en HT-29 humano en modelo de ratones desnudos

25

ES 2 912 734 T3

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células HT-29 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{a \times b^2}{2}$; $RTV = \frac{V}{V_0}$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento RTV}}{\text{grupo de control de modelo RTV}} \times 100 \%$.

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 36 y la Tabla 37).

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 16,10 %, el 49,72 % y el 70,14 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 16,24 %, el 32,41 % y el 55,74 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 19,22 %, el 41,35 % y el 63,19 %, respectivamente.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 81,60 %, el 49,22 % y el 29,11 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 84,18 %, el 79,34 % y el 44,05 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 85,54 %, el 53,48 % y el 35,63 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 36. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de células HT-29 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,29±1,40	21,04±1,39	2,35±0,44	
Ciclofosfamida	30	6/6	21,42±1,35	18,69±1,21	0,50±0,25***	78,87

Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,41±1,41	20,98±0,99	1,97±0,31	16,10
	50	6/6	21,31±1,53	20,56±1,09	1,18±0,34***	49,72
	100	6/6	20,77±1,13	21,19±1,26	0,70±0,29***	70,14
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	21,04±1,28	20,88±1,29	1,97±0,34	16,24
	50	6/6	21,36±1,35	20,9±1,29	1,59±0,49*	32,41
	100	6/6	20,80±0,89	21,53±1,08	1,04±0,40***	55,74
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,31±1,23	21,19±1,52	1,90±0,39	19,22
	50	6/6	21,22±1,24	21,00±0,98	1,38±0,37**	41,35
	100	6/6	21,34±1,78	21,09±1,43	0,87±0,34***	63,19

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5 Tabla 37. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de células HT-29 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Modelo Grupo	0	6/6	144,17±35,58	1976,26±294,65	14,41±3,95	
Ciclofosfamida	30	6/6	176,59±36,81	477,12±166,46***	2,86±1,44***	19,84
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	162,77±38,95	1803,98±271,55	11,76±4,03	81,60
	50	6/6	157,41±37,31	1109,16±320,27**	7,09±1,47*	49,22
	100	6/6	169,25±35,39	648,93±198,53***	4,19±2,23**	29,11
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	163,26±38,80	1885,85±219,49*	12,13±3,40	84,18
	50	6/6	142,56±22,44	1568,80±603,77*	11,43±5,13	79,34
	100	6/6	156,45±37,20	921,49±299,38***	6,35±2,87**	44,05
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	154,49±33,07	1803,16±368,50*	12,32±4,51	85,54
	50	6/6	161,76±30,69	1252,64±404,06*	7,70±1,65*	53,48
	100	6/6	160,38±38,86	826,76±259,70***	5,13±1,13**	35,63

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 18. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en HL-60 humano en modelo de ratones desnudos

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

15 Se tomaron células HL-60 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: grupos de isovaleril
20 espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio
25 de ratón desnudo.

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

30 Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = axb^2/2$; RTV = V/V_0 (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y T/C (%) = grupo de tratamiento RTV/grupo de control de modelo RTVx100 %.

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

- 5 Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = (1 - el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento/el peso tumoral promedio del grupo modelo) x 100 %.
- 10 Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 38 y la Tabla 39).
- 15 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 11,57 %, el 34,78 % y el 64,19 %, respectivamente.
- Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 15,92 %, el 29,48 % y el 51,81 %, respectivamente.
- 20 Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 17,10 %, el 29,92 % y el 55,05 %, respectivamente.
- El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo (P<0,05).
- 25 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 84,96 %, el 59,54 % y el 32,70 %, respectivamente.
- 30 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 75,39 %, el 65,18 % y el 41,36 %, respectivamente.
- Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 76,09 %, el 61,90 % y el 39,87 %, respectivamente.
- 35 No hay cambios significativos en los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con el peso del ratón de las dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 38. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de células HL60 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	20,85±1,36	20,71±1,39	2,26±0,34	
Ciclofosfamida	30	6/6	20,65±1,47	18,47±0,91	0,67±0,30***	70,30
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	20,75±1,20	20,66±1,08	2,00±0,34	11,57
	50	6/6	20,4±1,60	20,35±1,20	1,48±0,38**	34,78
	100	6/6	20,63±1,33	20,56±1,77	0,81±0,42***	64,19
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	20,78±1,31	20,59±1,54	1,90±0,33	15,92
	50	6/6	21,01±1,20	20,72±1,29	1,60±0,45*	29,48
	100	6/6	20,65±1,27	20,32±1,55	1,09±0,34***	51,81
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	20,60±1,57	20,67±1,51	1,88±0,25*	17,10
	50	6/6	20,82±1,42	20,59±1,36	1,59±0,45*	29,92
	100	6/6	20,21±1,87	20,25±1,22	1,01±0,41***	55,05

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

ES 2 912 734 T3

Tabla 39. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de células HL60 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	186,92±35,21	2009,89±276,25	11,25±3,65	
Ciclofosfamida	30	6/6	180,63±29,97	466,98±255,88***	2,78±1,89**	24,69
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	182,56±25,80	1702,01±305,75	9,56±2,41	84,96
	50	6/6	189,04±24,48	1230,70±332,94**	6,70±2,58*	59,54
	100	6/6	183,82±20,41	657,95±411,53***	3,68±2,51**	32,70
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	189,51±28,58	1596,76±293,76*	8,48±1,37	75,39
	50	6/6	184,06±32,38	1344,04±466,62*	7,33±2,36	65,18
	100	6/6	184,80±33,56	834,34±308,27***	4,65±1,77**	41,36
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	184,12±22,53	1543,27±190,73*	8,56±1,82	76,09
	50	6/6	189,31±24,59	1308,87±436,30*	6,96±2,25*	61,90
	100	6/6	188,01±27,66	789,65±404,78***	4,48±2,94**	39,87

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

19. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en cáncer de tiroides humano en modelo de ratones desnudos

5

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células TPC-1 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

10

15

20

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2 / 2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento RTV}}{\text{grupo de control de modelo RTV}} \times 100 \%$.

25

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

30

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

35

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 40 y la Tabla 41).

40

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 23,88 %, el 57,28 % y el 67,49 %, respectivamente.

45

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 20,91 %, el 31,61 % y el 62,04 %, respectivamente.

ES 2 912 734 T3

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 39,06 %, el 60,25 % y el 62,94 %, respectivamente.

5 El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina I con dosis bajas, medias y altas son el 65,45 %, el 43,43 % y el 28,11 %, respectivamente.

10 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina II con dosis bajas, medias y altas son el 86,15 %, el 59,08 % y el 38,61 %, respectivamente.

15 Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiramicina III con dosis bajas, medias y altas son el 61,93 %, el 45,01 % y el 34,75 %, respectivamente.

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiramicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

20 Tabla 40. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de tiroides humano TPC-1 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	21,40±1,74	24,456±1,46	2,42±0,22	--
Ciclofosfamida	30	6/6	21,56±1,54	19,16±1,75	0,69±0,37***	71,29
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	21,75±1,23	24,41±1,32	1,84±0,25**	23,88
	50	6/6	21,53±1,43	25,77±1,10	1,03±0,44***	57,28
	100	6/6	21,76±1,08	24,12±1,20	0,79±0,43***	67,49
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	20,54±1,45	21,16±1,37	1,91±0,33*	20,91
	50	6/6	20,07±1,13	12,45±1,63	1,65±0,32**	31,61
	100	6/6	21,78±1,53	12,11±1,20	0,92±0,42***	62,04
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	21,13±1,48	23,49±1,02	1,47±0,44**	39,06
	50	6/6	21,43±1,85	24,06±1,71	0,96±0,43***	60,25
	100	6/6	20,76±2,13	23,72±1,60	0,90±0,44***	62,94

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo modelo, ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo modelo, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo modelo

25 Tabla 41. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de tiroides humano TPC-1 en ratones desnudos ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	119,28±9,59	1948,78±84,91	16,46±1,92	--
Ciclofosfamida	30	6/6	117,10±4,88	724,64±285,14***	6,16±2,29***	37,40
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	115,05±9,93	1249,28±337,45**	10,77±2,47**	65,45
	50	6/6	119,45±4,30	847,07±356,87***	7,15±3,19***	43,43
	100	6/6	112,69±11,49	490,15±322,14***	4,63±3,34***	28,11
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	119,12±3,42	1689,63±210,37*	14,18±1,70	86,15
	50	6/6	118,54±6,49	1148,57±344,78**	9,72±3,02**	59,08
	100	6/6	117,30±6,48	754,42±320,69***	6,36±2,38***	38,61
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	119,35±3,84	1210,76±295,50**	10,19±2,79**	61,93
	50	6/6	116,75±5,22	866,73±306,25***	7,41±2,51***	45,01

	100	6/6	115,43±7,58	654,78±338,68***	5,72±3,04***	34,75
--	-----	-----	-------------	------------------	--------------	-------

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

20. Inhibición de isovaleril espiromicina I, II y III en cáncer de vejiga humano en modelo de ratones desnudos

5

Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón

Se tomaron células T-24 en una fase de crecimiento logarítmico y se sometieron a un experimento de exclusión de azul tripán que muestra que la viabilidad celular era más del 95 %, después las células se sometieron a tripsinización, centrifugación y retirada de sobrenadante. Después la concentración celular se ajustó a 1×10^7 /ml con matrigel, después cada ratón desnudo se inoculó por vía subcutánea con 0,2 ml de células en su axila derecha y se registró como el primer día de inoculación. Cuando el tumor crece para ser mayor que o igual a 100 mm^3 , los ratones se dividieron aleatoriamente en 11 grupos con 6 ratones en cada grupo: grupos de isovaleril espiromicina I con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, grupos de isovaleril espiromicina II con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg y grupos de isovaleril espiromicina III con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 30 días con una dosis de 20 ml/kg. Los ratones se sacrificaron el día siguiente después de la retirada del fármaco y se analizaron los indicadores. El diámetro largo y el diámetro corto del tumor y el peso corporal de cada ratón se registró cada 3 días desde la administración del fármaco hasta el sacrificio de ratón desnudo.

10

15

20

Cálculo del volumen tumoral y tasa de proliferación tumoral relativa

Se midieron el peso corporal de los ratones desnudos y el diámetro largo (a) y el diámetro corto (b) del tumor trasplantado cada 3 días y el volumen tumoral (V), volumen tumoral relativo (RTV) y tasa de proliferación tumoral relativa (T/C) se calculan respectivamente de acuerdo con las siguientes fórmulas, en donde $V = \frac{4}{3} \pi a b^2 / 2$; $RTV = V/V_0$ (V_0 es el volumen tumoral antes de la administración, V es el volumen tumoral antes del sacrificio) y $T/C (\%) = \frac{\text{grupo de tratamiento RTV}}{\text{grupo de control de modelo RTV}} \times 100 \%$.

25

Cálculo de la tasa de inhibición del crecimiento tumoral

Cada ratón se pesó y se sacrificó. Después de que el tumor se eliminara completamente del cuerpo del ratón, los tejidos no tumorales, tales como las manchas de la sangre y la grasa, se retiraron para pesar el tumor y calcular la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. El peso tumoral promedio de cada grupo de ratones se usa como un indicador de eficacia. Tasa de inhibición del crecimiento tumoral (%) = $(1 - \frac{\text{el peso tumoral promedio del grupo de tratamiento}}{\text{el peso tumoral promedio del grupo modelo}}) \times 100 \%$.

30

35

Los resultados de la prueba muestran que en comparación con el grupo de control, cada grupo administrado con fármaco tiene un cierto grado de inhibición sobre la tasa de inhibición del crecimiento tumoral, volumen tumoral, volumen tumoral relativo y tasa relativa de proliferación tumoral (véase la Tabla 42 y la Tabla 43).

40

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina I con dosis bajas, medias y altas son el 20,55 %, el 49,20 % y el 65,84 %, respectivamente.

45

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina II con dosis bajas, medias y altas son el 15,57 %, el 41,99 % y el 59,25 %, respectivamente.

Las tasas de inhibición del crecimiento tumoral de los grupos isovaleril espiromicina III con dosis bajas, medias y altas son el 21,00 %, el 44,84 % y el 61,30 %, respectivamente.

50

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo de los grupos isovaleril espiromicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas son significativamente más bajos que los del grupo modelo ($P < 0,05$).

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina I con dosis bajas, medias y altas son el 77,78 %, el 58,92 % y el 33,95 %, respectivamente.

55

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina II con dosis bajas, medias y altas son el 81,39 %, el 64,89 % y el 46,70 %, respectivamente.

Las tasas de proliferación tumoral relativas de los grupos isovaleril espiromicina III con dosis bajas, medias y altas son el 80,34 %, el 62,35 % y el 39,39 %, respectivamente.

60

No hay cambios significativos en el peso del ratón de los grupos isovaleril espiromicina I, II y III con dosis bajas, medias y altas en comparación con el grupo modelo.

Tabla 42. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la tasa de inhibición de tumor trasplantado de célula de cáncer de vejiga humano T-24 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d30)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	6/6	19,69±0,72	24,75±2,70	1,87±0,21	
Ciclofosfamida	30	6/6	19,53±0,61	27,28±1,43	0,51±0,12***	73,04
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	19,51±0,58	23,89±1,18	1,49±0,23*	20,55
	50	6/6	19,60±0,70	25,41±0,92	0,95±0,38***	49,20
	100	6/6	19,49±0,54	24,6±2,08	0,64±0,18***	65,84
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	19,91±0,28	24,81±2,42	1,58±0,28	15,57
	50	6/6	19,74±0,82	25,84±0,73	1,09±0,42**	41,99
	100	6/6	19,51±0,50	25,92±1,35	0,76±0,19***	59,25
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	19,57±0,52	25,72±1,53	1,48±0,43*	21,00
	50	6/6	19,61±0,44	26,47±0,52	1,03±0,42**	44,84
	100	6/6	19,90±0,58	25,05±0,93	0,73±0,20***	61,30

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo, **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

5

Tabla 43. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el cambio en el volumen de tumor trasplantado de célula de cáncer de vejiga humano T-24 en ratones desnudos ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	134,41±15,31	1772,51±198,69	13,21±0,72	
Ciclofosfamida	30	6/6	136,87±19,82	389,34±82,07	2,85±0,50	21,60
Isovaleril espiramicina I	25	6/6	139,84±15,80	1428,71±156,12	10,28±1,12	77,78
	50	6/6	131,81±7,15	1025,16±174,78	7,78±1,27	58,92
	100	6/6	134,21±14,43	606,16±136,06	4,48±0,75	33,95
Isovaleril espiramicina II	25	6/6	132,64±19,75	1414,36±88,91	10,75±1,34	81,39
	50	6/6	133,67±5,07	1142,42±146,91	8,57±1,31	64,89
	100	6/6	133,57±18,08	809,94±131,43	6,17±1,26	46,70
Isovaleril espiramicina III	25	6/6	135,55±18,08	1427,95±311,97	10,61±2,24	80,34
	50	6/6	136,32±15,54	1123,28±140,84	8,24±0,38	62,35
	100	6/6	134,53±20,46	697,48±130,89	5,20±0,71	39,39

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10

21. Inhibición de tumores trasplantados de cáncer de hígado H₂₂ de ratón y cáncer de pulmón de Lewis de ratón

15 Establecimiento de un modelo de tumor sólido de ratón:

Las cepas de células H₂₂ crioconservadas en nitrógeno líquido se resucitaron en ratones Kunming. Después de 3 generaciones, las ascitas de los ratones Kunming se tomaron y se colocaron en un tubo de centrifuga de 50 ml en el cual se añadieron 10 ml de solución salina normal al 0,9 % y después se realizó la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante obtenido. Después se añadieron 10 ml de solución salina normal al 0,9 % al tubo para soplar y mezclar bien y después la mezcla se diluyó a 5 x 10⁶ células vivas/ml con solución salina normal después de contar. El tubo se almacenó en agua con hielo y se usó etanol al 75 % para desinfectar la piel bajo las axilas derechas de los ratones. Cada ratón Kunming se inoculó pronto por vía subcutánea con 0,2 ml de las células en la axila de la extremidad anterior derecha.

25

Se cultivaron células de cáncer de pulmón de Lewis en un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Las células en la fase de crecimiento logarítmico se sometieron a tripsinización con tripsina al 0,25 %, después se recogieron las células para centrifugarse para retirar el sobrenadante obtenido, después se lavaron dos veces con solución salina normal estéril. Y después las células se suspendieron en la

solución salina normal para someterse a un ensayo de tinción con azul de tripán que muestra que la viabilidad celular era mayor que el 95 % y después se realizó el recuento celular. Las células de Lewis se ajustaron a 1×10^7 /ml en concentración y se almacenaron en agua con hielo. Se usó etanol al 75 % para desinfectar la piel bajo las axilas derechas de los ratones y cada ratón C57BL/6 se inoculó pronto por vía subcutánea con 0,2 ml de las células en su axila derecha.

5 Agrupamiento y método de administración de ratón

10 En el modelo de cáncer de hígado H₂₂, los ratones inoculados con el tumor se dividieron aleatoriamente en grupos con 10 ratones en cada grupo el siguiente día de la inoculación. Los grupos incluyeron: un grupo de control de modelo, un grupo de control de ciclofosfamida de fármaco positivo (CTX, 26 mg/kg), grupos isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg; grupos isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg; grupos isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 7 días con una dosis de 20 ml/kg.

15 En el modelo de cáncer de pulmón de Lewis, los ratones inoculados con el tumor se dividieron aleatoriamente en grupos con 10 ratones en cada grupo el siguiente día de la inoculación. Los grupos incluyeron: un grupo de control de modelo, un grupo de control de ciclofosfamida de fármaco positivo (CTX, 30 mg/kg), grupos isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg; grupos isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg; grupos isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg. Cada grupo se administró continuamente por vía intragástrica durante 15 días con una dosis de 20 ml/kg.

Cálculo de la tasa de inhibición del tumor:

25 Los ratones portadores de tumores se pesaron y se sacrificaron el día siguiente después de la última administración. Los tumores subcutáneos se diseccionaron y se pesaron. Se calcula el peso tumoral promedio de cada grupo y se calcula la tasa de inhibición del tumor.

$$\text{Tasa de inhibición del tumor} = (1 - T/C) \times 100 \%$$

30 T: peso tumoral promedio del grupo administrado con fármaco; C: peso tumoral promedio del grupo de control en blanco.

Resultados:

35 1. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en el tumor trasplantado de cáncer de hígado H₂₂ de ratón

40 Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 44, la tasa de inhibición tumoral del grupo de control de ciclofosfamida de fármaco positivo a cáncer de hígado H₂₂ de ratón Kunming es el 73,03 %. Los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg inhiben significativamente el crecimiento del cáncer de hígado H₂₂ en ratones.

45 El grupo de ciclofosfamida de fármaco positivo muestra una ligera disminución en el peso en comparación con el grupo de control normal. El peso de los ratones en cada uno de los grupos de isovaleril espiramicina I, II y III aumenta en comparación con el de antes de la administración, pero no hay diferencias significativas en comparación con el grupo de control del modelo.

Tabla 44. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en el tumor trasplantado de cáncer de hígado H₂₂ de ratón ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d7)	Tumor (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	10/10	23,83±0,43	26,13±1,26	1,52±0,58	
Ciclofosfamida	26	10/10	23,72±1,79	23,68±1,32	0,41±0,27***	73,03
Isovaleril espiramicina I	13	10/10	24,55±1,00	26,23±0,79	0,88±0,38*	42,11
	26	10/10	23,83±2,36	26,68±1,85	0,68±0,24**	55,26
	52	10/10	24,02±2,83	27,87±1,57	0,52±0,68***	65,79
Isovaleril espiramicina II	13	10/10	24,22±2,15	27,27±2,20	1,22±0,31	19,74
	26	10/10	24,72±1,69	27,35±0,80	1,06±0,33*	30,26
	52	10/10	23,45±1,69	27,02±0,90	0,83±0,46**	45,39
Isovaleril espiramicina III	13	10/10	23,67±3,73	26,33±1,43	1,01±0,22*	33,55
	26	10/10	24,13±1,46	27,47±1,21	0,85±0,34*	44,08
	52	10/10	24,32±1,12	27,35±0,80	0,73±0,45**	51,97

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo; ## p<0,05 en comparación con el grupo ciclofosfamida

5 Tabla 45. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el volumen tumoral de tumor trasplantado de cáncer de hígado H₂₂ de ratón KM ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	118,93±13,02	1183,27±297,43	9,93±2,45	
Ciclofosfamida	30	6/6	119,60±31,11	307,34±79,91***	2,86±1,44***	28,78
Isovaleril espiramicina I	12,5	6/6	120,26±24,42	657,57±231,56**	5,41±1,42**	54,47
	25	6/6	118,32±11,90	563,69±63,08**	4,79±0,64**	48,27
	50	6/6	120,68±13,76	359,74±80,81***	2,96±0,39***	29,78
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	120,80±18,48	931,38±141,51*	7,83±1,50*	78,85
	25	6/6	118,02±10,35	779,30±292,34**	6,56±2,19**	66,04
	50	6/6	118,18±14,68	659,02±138,35**	5,58±0,95**	56,20
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	121,58±13,44	824,36±143,90*	6,92±1,88*	69,68
	25	6/6	118,16±21,72	650,32±171,23**	5,65±1,74**	56,90
	50	6/6	122,15±49,44	468,19±110,04***	4,31±1,65***	43,45

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

10 2. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en el tumor trasplantado de cáncer de pulmón de Lewis de ratón

15 Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 46, la tasa de inhibición tumoral del grupo de control de ciclofosfamida de fármaco positivo a cáncer de pulmón de Lewis de ratón es el 76,43 %. Los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg inhiben significativamente el crecimiento del cáncer de pulmón de Lewis en ratones. El peso de los ratones en cada uno de los grupos de isovaleril espiramicina I, II y III aumenta en comparación con el de antes de la administración, pero no hay diferencias significativas en comparación con el grupo de control del modelo.

20 Tabla 46. Inhibición de isovaleril espiramicina I, II y III en el tumor trasplantado de cáncer de pulmón de Lewis de ratón ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Peso corporal (g) (d1)	Peso corporal (g) (d15)	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de modelo	0	10/10	19,60±1,07	22,70±1,28	1,60±0,56	
Ciclofosfamida	30	10/10	19,62±1,01	21,38±0,67	0,38±0,07***	76,43
Isovaleril espiramicina I	13	10/10	19,93±1,20	22,70±0,87	0,85±0,24*	46,94
	26	10/10	19,45±0,68	23,43±1,41	0,59±0,06**	62,97
	52	10/10	19,87±1,17	23,25±0,43	0,45±0,14***	71,83
Isovaleril espiramicina II	13	10/10	20,33±0,64	22,17±1,74	0,98±0,37	38,67
	26	10/10	19,62±1,43	22,38±0,96	0,89±0,18*	44,26
	52	10/10	20,05±0,67	22,75±0,95	0,70±0,21**	56,34
Isovaleril espiramicina III	13	10/10	19,62±1,30	22,52±0,57	1,03±0,18*	35,46
	26	10/10	19,58±0,63	22,28±0,66	0,82±0,34*	48,96
	52	10/10	20,00±0,60	22,42±1,66	0,68±0,18**	57,54

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo; ##p<0,05 en comparación con el grupo ciclofosfamida

Tabla 47. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el volumen tumoral de tumor trasplantado de células H₂₂ de ratón KM ($\bar{x}\pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (Inicio/Fin)	Volumen tumoral (mm ³) (d1)	Volumen tumoral (mm ³) (d30)	Volumen tumoral relativo (RTV)	Tasa de proliferación tumoral relativa (T/C)
Grupo de modelo	0	6/6	104,31±16,13	1818,28±397,72	16,01±4,15	
Ciclofosfamida	30	6/6	104,35±30,89	371,39±112,68***	3,93±1,86***	24,55
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	104,68±20,89	955,73±330,24**	9,22±2,95**	57,56
	25	6/6	104,31±19,76	756,20±145,84**	7,29±0,82**	45,51
	50	6/6	103,79±19,55	465,26±52,94***	4,65±1,27***	29,05
Isovaleril espiramicina II	12,5	6/6	104,18±19,49	1304,48±379,51*	12,89±4,69*	80,51
	25	6/6	103,63±19,46	1119,26±338,67*	11,04±4,07*	68,97
	50	6/6	103,38±18,03	798,42±189,19**	7,81±1,76**	48,76
Isovaleril espiramicina III	12,5	6/6	105,02±31,31	1270,87±198,05*	13,54±6,73*	84,57
	25	6/6	103,29±29,09	841,92±385,16**	9,35±5,89**	58,38
	50	6/6	104,43±23,09	677,35±237,77**	6,69±2,56**	41,81

* p<0,05 en comparación con el grupo modelo; **p<0,01 en comparación con el grupo modelo, ***p<0,001 en comparación con el grupo modelo

22. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la función inmunitaria de ratones portadores de tumores

5

Método

1. Efecto sobre el índice del timo y el índice del bazo de ratones portadores de tumores

10 Después de que los ratones portadores de tumor se sacrifiquen, se pesan el bazo y el timo y se calculan el índice de bazo y el índice de timo.

2. Efectos sobre la actividad de proliferación de linfocitos y la actividad de células citolíticas naturales (NK) de ratones portadores de tumores

15

2.1 Preparación de linfocitos de bazo

20 El medio RPMI 1640 sin suero se colocó en una placa y después la placa se colocó sobre hielo. Se tomó aseptícamente el bazo y se trituró suavemente con un portaobjetos de vidrio estéril para preparar una suspensión de células individuales. La suspensión de células individuales se filtró con una gasa estéril de doble capa, se lavó dos veces con medio RPMI sin suero 1640 y se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min para retirar el sobrenadante obtenido. Se añadieron 2 ml de lisado de glóbulos rojos a la suspensión tratada, la mezcla se dejó estar durante 2 min y después se añadieron 8 ml de medio RPMI 1640, la centrifugación se realizó a 1.500 rpm durante 5 min para retirar el sobrenadante obtenido y después el lavado se realizó dos veces con el medio RPMI 1640. Se realizó tinción con azul de tripán para contar el número de células vivas y la viabilidad celular era más del 95 %. Se preparó una suspensión de células individuales usando un medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 %.

25

2.2 Ensayo de actividad de proliferación de linfocitos de bazo

30

35 Se tomó la suspensión de células del bazo y se ajustó la densidad celular a 1×10^7 /ml. Cada ratón se estableció con: A. un pocillo control: se añadieron 100 μ l de medio RPMI 1640; B. un pocillo de estimulación de concanavalina A (ConA): se añadieron 100 μ l (10 mg/l) de solución de concanavalina A (ConA); y C. un pocillo de estimulación de endotoxina bacteriana (LPS): se añadieron 100 μ l (20 mg/l) de solución de endotoxina bacteriana (LPS). Se añadieron las células anteriores a una placa de 96 pocillos y después se añadieron 100 μ l de suspensión de células de bazo a cada uno de los pocillos anteriores. Después de que la placa de cultivo se transfiriera a una condición de humedad saturada con una fracción de volumen de CO₂ al 5 % a 37 °C para la incubación durante 72 h, se añadieron 10 μ l de solución MTT (5 g/l) a cada pocillo y la incubación se continuó para realizarse durante 4 horas bajo las mismas condiciones, después se terminó el cultivo. Se añadieron 100 μ l de una solución triple (10 g de SDS, 0,1 ml de HCl 10 M, 5 ml de wasobutanol, diluido con agua destilada hasta 100 ml) y la placa se agitó durante 10 min para disolver completamente los cristales. La densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió a 570 nm y se calculó la tasa de proliferación de linfocitos. Tasa de proliferación de linfocitos (%) = [(T-C)/C] x 100 %, en donde T era la densidad óptica del pocillo de estimulación y C es la densidad óptica del pocillo control.

40

45

2.3 Ensayo de actividad de células citolíticas naturales (NK)

Se tomó la suspensión de células del bazo y se ajustó la densidad celular a 1×10^7 /ml (células efectoras). Se preparó una suspensión de células K562 con una densidad celular de 1×10^5 /ml (células diana). Cada ratón se estableció con: A. células efectoras: pocillo de célula diana (relación de cantidad 20:1) a la cual se añadieron 20 μ l de suspensión de células de bazo y 100 μ l de suspensión de células K562; B. un pocillo control de células efectoras al cual se añadieron 100 μ l de suspensión de células de bazo y 100 μ l de medio RPMI 1640; y C. un pocillo control de células diana al cual se añadieron 100 μ l de suspensión de células K562 y 100 μ l de medio RPMI 1640. Se añadieron las células anteriores a una placa de 96 pocillos. Después de que la placa de 96 pocillos se transfiriera a una condición de humedad saturada con una fracción de volumen de CO₂ al 5 % a 37 °C para la incubación durante 22 h, se añadieron 10 μ l de solución MTT (5 g/l) a cada pocillo y la incubación se continuó para realizarse durante 4 horas bajo las mismas condiciones, después se terminó el cultivo. Se añadieron 100 μ l de una solución triple (10 g de SDS, 0,1 ml de HCl 10 M, 5 ml de isobutanol, diluido con agua destilada hasta 100 ml) y la placa se agitó durante 10 min para disolver completamente los cristales y la Densidad Óptica (DO) de cada pocillo a 490 nm se midió y se calculó la actividad de células NK. Actividad de células NK (%) = $[TO-(S-E)]/TO \times 100$ %, en donde TO es la densidad óptica del pocillo control de célula diana, S es la densidad óptica del pocillo control de célula efectora y E es la densidad óptica de la célula efectora.

Resultados:

1. Efecto sobre el índice del timo y el índice del bazo de ratones portadores de tumores de cáncer de hígado H₂₂

Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 48, el índice del timo y el índice de bazo del grupo control de ciclofosfamida de fármaco positivo son significativamente más bajos que los del grupo control ($P < 0,01$). Los índices del timo de los ratones en los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg no tienen cambios significativos en comparación con los del grupo control.

Tabla 48. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el índice del timo y el índice del bazo (w) de ratones portadores de tumores de cáncer de hígado H₂₂ ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Índice del bazo (%)	Índice del timo (%)
Grupo control	0	0,66 \pm 0,12	0,13 \pm 0,05
Ciclofosfamida	26	0,38 \pm 0,09**	0,04 \pm 0,02**
Isovaleril espiramicina I	13	0,72 \pm 0,07	0,15 \pm 0,07
	26	0,60 \pm 0,15	0,14 \pm 0,01
	52	0,86 \pm 0,25*	0,12 \pm 0,04
Isovaleril espiramicina II	13	0,59 \pm 0,24	0,12 \pm 0,05
	26	0,68 \pm 0,24	0,16 \pm 0,03
	52	0,64 \pm 0,17	0,17 \pm 0,10
Isovaleril espiramicina III	13	0,68 \pm 0,15	0,15 \pm 0,06
	26	0,66 \pm 0,21	0,15 \pm 0,05
	52	0,65 \pm 0,26	0,13 \pm 0,02

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo control; ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo control

2. Efecto sobre el índice del timo y el índice del bazo de ratones portadores de tumores de cáncer de pulmón de Lewis

Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 49, el índice del bazo del grupo control de ciclofosfamida de fármaco positivo es significativamente más bajo que el del grupo control ($P < 0,01$). El índice del bazo y el índice del timo de los ratones en los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg no son significativamente diferentes de aquellos en el grupo control.

Tabla 49. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en el índice del timo y el índice del bazo (w) de ratones portadores de tumores de cáncer de pulmón de Lewis ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Índice del bazo (%)	Índice del timo (%)
Grupo control	0	0,76 \pm 0,12	0,12 \pm 0,05
Ciclofosfamida	26	0,48 \pm 0,09**	0,06 \pm 0,02**

Isovaleril espiramicina I	13	0,72±0,21	0,12±0,03
	26	0,62±0,15	0,13±0,04
	52	0,77±0,14*	0,12±0,06
Isovaleril espiramicina II	13	0,75±0,24	0,12±0,08
	26	0,68±0,21	0,14±0,02
	52	0,66±0,17	0,15±0,09
Isovaleril espiramicina III	13	0,62±0,25	0,12±0,10
	26	0,68±0,11	0,11±0,07
	52	0,74±0,23	0,13±0,06

** p<0,01 en comparación con el grupo control; *p<0,05 en comparación con el grupo control;

3. Efecto sobre la actividad de células NK de ratones portadores de tumores de cáncer de pulmón de Lewis

- 5 Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 50, la actividad de células NK del grupo control de ciclofosfamida de fármaco positivo es significativamente más bajo que el del grupo control (P<0,05).

10 Las actividades de células NK en los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg aumentan significativamente en comparación con las del grupo control (P<0,01).

Tabla 50. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la actividad de células NK de portadores de tumor de cáncer de pulmón de Lewis ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Actividad de células NK (%)
Grupo control	0	46,2±5,2
Ciclofosfamida	26	35,4±6,6*
Isovaleril espiramicina I	13	52,5±9,2
	26	67,0±12,1**
	52	39,8±6,8
Isovaleril espiramicina II	13	47,2±9,2
	26	47,0±5,5
	52	43,1±7,3
Isovaleril espiramicina III	13	48,9±6,6
	26	46,0±11,8
	52	49,8±6,2

- 15 ** p<0,01 en comparación con el grupo control; *p<0,05 en comparación con el grupo control;

4. Efecto sobre la actividad de proliferación de linfocitos de ratones portadores de tumores de cáncer de pulmón de Lewis

20 Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 51, la actividad de linfocitos del grupo de control de ciclofosfamida de fármaco positivo se inhibe significativamente (P < 0,05). Las actividades de linfocitos de los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg aumentan significativamente en comparación con las del grupo control (P<0,05, P<0,01).

25 Tabla 51. Efecto de isovaleril espiramicina I, II y III en la proliferación de linfocitos en ratones de tumor trasplantado de cáncer de pulmón de Lewis ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Actividad de proliferación de linfocitos B (%)	Actividad de proliferación de linfocitos T (%)
Grupo control	0	30,37±10,16	17,60±7,39
Ciclofosfamida	26	11,63±4,68*	13,24±3,72*
Isovaleril espiramicina I	13	41,63±7,06*	25,27±8,20**
	26	44,81±4,41*	36,24±2,15**

	52	32,71±1,84	22,26±4,33
Isovaleril espiramicina II	13	39,88±3,57	16,87±3,28
	26	32,68±2,68	15,82±1,68
	52	35,94±3,80	19,28±2,35
Isovaleril espiramicina III	13	33,91±2,65	20,17±5,18
	26	34,69±0,34	18,51±2,60
	52	32,28±1,27	18,25±1,89

* p<0,05 en comparación con el grupo control; **p<0,01 en comparación con el grupo control;

5. Efecto sobre el índice del bazo de ratones portadores de tumores de cáncer de pulmón A549

- 5 Como puede verse a partir de los resultados en la Tabla 52, el índice del bazo del grupo control de ciclofosfamida de fármaco positivo es significativamente más bajo que el del grupo control (P<0,01). El índice del bazo de los ratones en los grupos de isovaleril espiramicina I con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg, los grupos de isovaleril espiramicina II con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg y los grupos de isovaleril espiramicina III con dosis de 13, 26 y 52 mg/kg no cambia significativamente en comparación con el del grupo control.

10 Tabla 52. Efecto de las isovaleril espiramicina I, II y III en el índice de bazo de ratones portadores de tumores de cáncer de pulmón A549 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Grupo	Dosis (mg/kg)	Índice del bazo (%)
Grupo control	0	0,31±0,04
Ciclofosfamida	26	0,21±0,07*
Isovaleril espiramicina I	13	0,32±0,12
	26	0,38±0,09
	52	0,31±0,08
Isovaleril espiramicina II	13	0,35±0,06
	26	0,32±0,09
	52	0,37±0,06
Isovaleril espiramicina III	13	0,32±0,02
	26	0,33±0,11
	52	0,35±0,09

* p<0,05 en comparación con el grupo control

- 15 Las anteriores son solo realizaciones preferidas de la presente descripción y no pretenden limitar la presente descripción de ninguna forma. Aunque la presente descripción se ha descrito en las realizaciones preferidas anteriores, no se pretende que limiten la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Isovaleril espiramicina I o III para su uso en el tratamiento y/o prevención de tumores, en donde el tumor es cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer renal, tumor cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, tumor de piel maligno o linfoma o leucemia.
5
2. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 1, en donde el tumor cerebral es glioma o meningioma y el cáncer gástrico es adenocarcinoma gástrico.
10
3. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde un medicamento está en diversas formulaciones que incluyen isovaleril espiramicina I o III y adyuvantes farmacéuticamente aceptables o el medicamento está en diversas formulaciones incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de isovaleril espiramicina I o III y adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
15
4. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde un medicamento está en diversas formulaciones que incluyen isovaleril espiramicina I o III, fármacos antitumorales y adyuvantes farmacéuticamente aceptables o el medicamento está en diversas formulaciones incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de isovaleril espiramicina I o III, fármacos antitumorales y los adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
20
5. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde un medicamento es una combinación de un primer agente y un segundo agente, el primer agente contiene isovaleril espiramicina I o III y las sales farmacéuticamente aceptables de isovaleril espiramicina I o III y el segundo agente contiene un fármaco antitumoral.
25
6. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 4 o 5, en donde el fármaco antitumoral es uno o más de un fármaco seleccionado de un grupo que contiene un fármaco de quimioterapia, un fármaco de radioterapia, un fármaco de terapia dirigida y un fármaco inmunoterapéutico.
30
7. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 4 o 5, en donde una dosis de isovaleril espiramicina I o III en el medicamento está en un intervalo de 5 a 1.500 mg.
35
8. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 7, en donde una dosis de isovaleril espiramicina I o III en el medicamento está en un intervalo de 50 a 1.000 mg.
9. Isovaleril espiramicina I o III para su uso según la reivindicación 8, en donde una dosis de isovaleril espiramicina I o III en el medicamento está en un intervalo de 100 a 400 mg.
40