

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 340**

51 Int. Cl.:

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/09 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2010 E 10811021 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2470177**

54 Título: **Terapia de la combinación para el tratamiento de enfermedades proliferativas**

30 Prioridad:

27.08.2009 AU 2009904098

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

10.09.2015

73 Titular/es:

**BIONOMICS LIMITED (100.0%)
31 Dalgleish Street
Thebarton, S.A. 5031, AU**

72 Inventor/es:

**KREMMIDIOTIS, GABRIEL;
BIBBY, DAVID y
LESKE, ANNABELL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 340 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

Terapia de la combinación para el tratamiento de enfermedades proliferativas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a nuevas combinaciones químicas para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas y, en particular, del cáncer.

10 Antecedentes de la invención

Por lo general, el cáncer se trata con quimioterapia y/o radioterapia. Si bien suelen ser eficaces para destruir una cantidad significativa de las células tumorales, a menudo, dichas terapias dejan atrás una serie de células tumorales que son resistentes al tratamiento. Estas células resistentes pueden proliferar, formando nuevos tumores que luego serán resistentes al tratamiento. El uso de combinaciones conocidas de fármacos quimioterapéuticos ha dado lugar a las células tumorales resistentes a múltiples fármacos ("MDR").

El modo de las enfermedades proliferativas tales como el cáncer es multifactorial. Por ejemplo, la investigación realizada en los últimos cuarenta años ha conducido a la conclusión de que los agentes citotóxicos (o agentes antiproliferativos) incluyen agentes antimetabólicos que interfieren en la formulación de los microtúbulos, agentes alquilantes que son capaces de reticular el ADN, agentes a base de platino que son capaces de interferir en la alquilación del ADN mediante el bloqueo de la replicación del ADN, agentes antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, etc. En el tratamiento de dichas enfermedades, se pueden combinar fármacos con diferentes mecanismos (por ejemplo, las terapias de la combinación) con efectos beneficiosos incluyendo el tratamiento eficaz de las células tumorales MDR y la minimización de los efectos secundarios tales como la citotoxicidad no deseada. La dificultad en este caso es, sin embargo, que no todos los agentes antiproliferativos conocidos proporcionan efectos útiles o beneficiosos en combinación y, por consiguiente, en la actualidad, la investigación realizada en muchos laboratorios se centra en el desarrollo de nuevos y útiles fármacos antiproliferativos que se puedan combinar.

30 Crazzolaro Roman *et al.* han publicado en "Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia", *Blood*, vol. 113, Nº 14, abril de 2009 (2009-04), páginas 3297-3306, que el everolimus potencia el efecto de la vincristina en el tratamiento de la leucemia.

35 La publicación de patente internacional WO2007/087684 A1 desvela compuestos de fórmula (III).

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica que comprende: (a) un inhibidor de la polimerización de la tubulina de fórmula (III) mostrada más adelante; y (b) everolimus como inhibidor de mTOR.

45 La presente invención también proporciona el uso de: (a) un inhibidor de la polimerización de la tubulina de fórmula (III) mostrada más adelante; y (b) everolimus como inhibidor de mTOR, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neoplásica.

50 Sorprendentemente, se ha encontrado que los efectos en el tratamiento de enfermedades proliferativas con una combinación que comprende: (a) un inhibidor de la polimerización de la tubulina de fórmula (III) mostrada más adelante; y (b) everolimus como inhibidor de mTOR, son mayores que los efectos que se pueden lograr con cualquiera de (a) o (b) por sí solos. Es decir, se ha encontrado que las presentes combinaciones poseen un efecto aditivo o sinérgico.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1 - Diagrama esquemático que ilustra los efectos propuestos de la combinación de la presente invención.

Figura 2 - Tabla que muestra los valores de índice de la combinación para la combinación del compuesto del Ejemplo 2 con temsirolimus con respecto a diversas líneas celulares cancerosas.

60 Figura 3 - Imagen que representa el análisis de inmunohistoquímica de xenoinjertos renales humanos tratados con el Ejemplo 2.

65 Figura 4 - representa un gráfico del % del control de perfusión contra una cantidad de compuesto (mg/kg) en relación con los niveles comparativos de insuficiencia vascular (reducción de la perfusión tumoral) entre CA4P y el compuesto del Ejemplo 2 de la presente invención.

- Figura 5 - representa un gráfico de la proporción de volumen tumoral (Día*/Día 1) frente al tiempo (Días) en relación con la inhibición del crecimiento tumoral del compuesto del Ejemplo 2 en ratones Balb/c nu/nu portadores de tumores sólidos de mama ortotópicos MDA-MB-231.
- 5 Figura 6 - representa un gráfico del volumen tumoral (mm³) frente al tiempo (Días) de xenoinjertos Caki-1 tratados con el Ejemplo 2 y el inhibidor de mTOR rapamicina (±ETM).
- Figura 7 - representa un gráfico del porcentaje de supervivencia frente al tiempo (Días) para la supervivencia de los ratones que tienen xenoinjertos Caki-1 tratados con el Ejemplo 2 e inhibidor de mTOR rapamicina.
- 10

Descripción de las realizaciones preferidas

15 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a no ser que el contexto lo requiera de otro modo, el término "comprenden" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o una etapa o un grupo de números enteros o de etapas indicados, pero sin la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

20 La referencia en la presente memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de la misma) o a cualquier otra materia que sea conocida, no es, y no se considerará como, el reconocimiento ni la admisión, ni ninguna forma de sugerir que dicha publicación anterior (o información derivada de la misma) o materias conocidas formen parte del conocimiento común en el campo del intento al que se refiere la presente memoria descriptiva.

25 Componente (a) de la combinación; inhibidor de la polimerización de la tubulina (TPI)

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de la polimerización de la tubulina" se refiere a todos y cada uno de los compuestos que interaccionan directamente con la tubulina e inhiben la polimerización de la tubulina y, como consecuencia, que interfieren en la función fisiológica de los microtúbulos. Los inhibidores de la polimerización de tubulina (TPI) a menudo se denominan agentes "desestabilizadores" de los microtúbulos. Dichos compuestos se han de comparar con los compuestos que interaccionan con la tubulina como los taxanos y las epotilonas, que estabilizan los polímeros de tubulina e inhiben la despolimerización de la tubulina (es decir, los agentes estabilizadores de microtúbulos)).

35 Los ejemplos de TPI incluyen:

(i) Compuestos sintéticos

- ABT-751 (E7010, Abbott);
- 40 • MPC-6827 (Azixa™, Myriad Pharmaceuticals);
- AEZS- 112 (ZEN-012, Eterna Zentaris);
- CYT997 (Cytopia);
- MN-029 (Denibulina, MediciNova/Angiogene);
- EPC2407 (EpiCept);
- 45 • ZIO-301 (indibulina, Ziopharm Oncology).

(ii) Derivados de productos naturales

- Vinflunina (Javlor, Pierre Fabre), así como otros alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina y vinorelbina);
- 50 • Combretastatinas
- CA4 (Zybrestat™, OXiGENE);
- Oxi4503 (OXiGENE);
- 55 • AVE8062 (AC7700, Sanofi Aventis);
- Eribulina mesilato (E7389, Eisai);
- Dolastatina 10 (NCI)
- Tasidotina (sintadotina, Genzyme);
- 60 • 2-metoxiestradiol (2ME2 o Panzem®, EntreMed);
- E7974 (Eisai);
- NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals).

65 Los microtúbulos son polímeros filamentosos que son componentes clave del citoesqueleto celular. Son estructuras dinámicas que fluctúan entre los estados de polimerización y despolimerización. Esta propiedad permite a los

microtúbulos modular la forma, la adhesión, la migración y la proliferación de las células. Los TPI interrumpen directamente los procesos de polimerización de los microtúbulos y, por consiguiente, tienen la capacidad de efectuar cambios en la forma de las células y de inhibir la proliferación celular. Estas propiedades son esenciales para el uso de los TPI como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y en las combinaciones de la presente invención.

Los compuestos TPI son importantes en el tratamiento de los cánceres, principalmente como resultado de su capacidad para interrumpir selectivamente el flujo sanguíneo a través de un tumor. La inhibición de la polimerización de la tubulina dirigida ha sido una metodología contra el cáncer muy bien validada a través del desarrollo y, actualmente, el amplio uso clínico de los agentes TPI quimioterapéuticos.

Los TPI se pueden clasificar en función de su sitio de unión a la tubulina específico.

La unión de los alcaloides de la vinca a la tubulina define un sitio que media la actividad de desestabilización de la tubulina observada con estos compuestos. Se ha demostrado que el sitio de los alcaloides de la vinca se une directamente a una serie de compuestos que efectúan la desestabilización de la tubulina.

La unión de la colchicina a la tubulina define un sitio de unión independiente que, como en el caso del sitio de los alcaloides de la vinca, provoca la desestabilización de la tubulina. Aunque los TPI que se unen a los sitios de la vinca han tenido éxito como agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, los que se unen al sitio de la colchicina han sido desatendidos en comparación, posiblemente debido a la falta de márgenes terapéuticos ofrecidos por la colchicina. Sin embargo, más recientemente, se ha descrito una serie de agentes de unión al sitio de la colchicina que tienen la capacidad de interrumpir los vasos sanguíneos del interior de los tumores sólidos. Estos TPI se conocen como agentes de interrupción vascular (VDA). Muchos de los agentes de unión al sitio de la colchicina que presentan capacidad de VDA se basan en productos naturales tales como las combretastatinas (CA4P, OXi-4503, AVE-8062), las colchicinas (ZD6126) y la fenilhistina (NPI-2358), mientras que otros son compuestos sintéticos (MN-029 y EPC2407).

Los TPI actúan como VDA debido a que interfieren en la integridad de los microtúbulos, lo que conduce a cambios en el citoesqueleto de las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del tumor. Como resultado de ello, estas células generalmente planas se vuelven más redondeadas, y pierden su contacto de célula a célula. Estos hechos conducen al estrechamiento de los vasos sanguíneos del tumor y, en última instancia, a la oclusión del flujo sanguíneo a través de los vasos. La selectividad tumoral asociada a estos agentes se debe al hecho de que la vasculatura del tumor es más débil y más propensa a colapsarse que la vasculatura normal. Sin embargo, se produce una serie de toxicidades limitantes de la dosis, que están asociadas con los VDA debido a una reducción del flujo sanguíneo en los tejidos sanos.

Los TPI pueden actuar mediante la unión al sitio colchicina de la tubulina. Los ensayos que se pueden usar para determinar si un TPI actúa en el sitio de unión a la colchicina de la tubulina son conocidos en la técnica, tal como en Ma R. *et al*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008, septiembre 62 (4) 559-68.

Los TPI que pueden actuar en el sitio de unión a la colchicina se pueden basar en furanos anulados (por ejemplo, benzofuranos, furo[2,3-d]pirimidin-2(1H)-onas, etc.), benzotiofeno y armazones estructurales de indol tales como los desvelados en los documentos US 7.456.214; US 7.429.681; US 7.071.190; US 6.849.656; US 5.886.025; US 6.162.930; US 6.350.777, US 5.340.062, WO 06/084338, WO 02/060872, WO 07/087684 y WO 08/070908.

Dicho TPI se puede seleccionar entre los TPI desvelados en los documentos WO 06/084338, WO 07/087684 o WO 08/070908.

Definiciones químicas

"Alquilo" se refiere a grupos alquilo monovalentes que pueden ser de cadena lineal o ramificada y que preferentemente tienen de 1 a 10 átomos de carbono o más preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono, e incluso más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de dichos grupos alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *n*-hexilo y similares.

"Alquileno" se refiere a grupos alquilo divalentes que preferentemente tienen de 1 a 10 átomos de carbono y más preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono, e incluso más preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono. Los ejemplos de dichos grupos alquileno incluyen metileno (-CH₂-), etileno (-CH₂CH₂-) y los isómeros de propileno (por ejemplo, -CH₂CH₂CH₂- y -CH(CH₃)CH₂-) y similares.

"Ariilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado que tiene un anillo sencillo (por ejemplo, fenilo) o varios anillos condensados (por ejemplo, naftilo o antrilo), que preferentemente tiene de 6 a 14 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos ariilo incluyen fenilo, naftilo y similares.

"Ariileno" se refiere a un grupo ariilo divalente, en el que el grupo ariilo es como se ha descrito anteriormente.

"Ariloxi" se refiere a un grupo aril-O-, en el que el grupo arilo es como se ha descrito anteriormente.

5 "Ariilquilo" se refiere a grupos -alquilen-arilo que tienen preferentemente de 1 a 10 átomos de carbono en el resto alquilen y de 6 a 10 átomos de carbono en el resto arilo. Dichos grupos ariilquilo se ilustran por bencilo, fenetilo y similares.

10 "Ariilalcoxi" se refiere a un grupo ariilalquil-O-, en el que el grupo ariilquilo es como se ha descrito anteriormente. Dichos grupos ariilalcoxi se ilustran por benciloxi y similares.

"Alcoxi" se refiere al grupo alquil-O-, en el que el grupo alquilo es como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *iso*-propoxi, *n*-butoxi, *terc*-butoxi, *sec*-butoxi, *n*-pentoxi, *n*-hexoxi, 1,2-dimetilbutoxi y similares.

15 "Alquenilo" se refiere a un grupo alquenilo monovalente que puede ser de cadena lineal o ramificada y que preferentemente tiene de 2 a 10 átomos de carbono y más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono y tiene al menos 1 y preferentemente 1-2, dobles enlaces carbono a carbono. Los ejemplos incluyen etenilo (-CH=CH₂), *n*-propenilo (-CH₂CH=CH₂), *iso*-propenilo (-C(CH₃)=CH₂), but-2-enilo (-CH₂CH=CHCH₃) y similares.

20 "Alqueniloxi" se refiere al grupo alquenil-O-, en el que el grupo alquenilo es como se ha descrito anteriormente.

"Alquenileno" se refiere a grupos alquenilo divalentes que tienen preferentemente de 2 a 8 átomos de carbono y más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen etenileno (-CH=CH-) y los isómeros de propenileno (por ejemplo, -CH₂CH=CH- y -C(CH₃)=CH-) y similares.

25 "Alquinilo" se refiere a grupos alquinilo que tienen preferentemente de 2 a 10 átomos de carbono y más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono y que tienen al menos 1, y preferentemente de 1-2, triples enlaces carbono a carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo (-C≡CH), propargilo (-CH₂C≡CH), pent-2-inilo (-CH₂C≡CCH₂-CH₃) y similares.

30 "Alquiniloxi" se refiere al grupo alquinil-O-, en el que el grupo alquinilo es como se ha descrito anteriormente.

35 "Alquinileno" se refiere a grupos alquinilo divalentes que tienen preferentemente de 2 a 8 átomos de carbono y más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen etinileno (-C≡C-), propinileno (-CH₂-C≡C-) y similares.

"Acilo" se refiere a grupos H-C(O)-, alquil-C(O)-, cicloalquil-C(O)-, aril-C(O)-, heteroaril-C(O)- y heterociclil-C(O)-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se han descrito en el presente documento.

40 "Oxiacilo" se refiere a grupos HOC(O)-, alquil-OC(O)-, cicloalquil-OC(O)-, aril-OC(O)-, heteroaril-OC(O)- y heterociclil-OC(O)-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se han descrito en el presente documento.

45 "Amino" se refiere al grupo -NR*R*, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

50 "Aminoacilo" se refiere al grupo -C(O)NR*R*, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

55 "Aminoacilamino" se refiere al grupo -NR*C(O)NR*R*, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

"Acilamino" se refiere al grupo -NR*C(O)R*, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

60 "Aciloxi" se refiere a los grupos -OC(O)-alquilo, -OC(O)-arilo, -C(O)O-heteroarilo y -C(O)O-heterociclilo, donde alquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se han descrito en el presente documento.

65 "Aminoaciloxi" se refiere a los grupos -OC(O)NR*-alquilo, -OC(O)NR*-arilo, -OC(O)NR*-heteroarilo y -OC(O)NR*-heterociclilo, donde R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

- 5 "Oxiacilamino" se refiere a los grupos $\text{-NR}^*\text{C(O)O-}$ alquilo, $\text{-NR}^*\text{C(O)O-}$ arilo, $\text{-NR}^*\text{C(O)O-}$ heteroarilo y $\text{-NR}^*\text{C(O)O-}$ heterociclilo, donde R^* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.
- "Oxiaciloxi" se refiere a los grupos -OC(O)O- alquilo, -O-C(O)O- arilo, -OC(O)O- heteroarilo y -OC(O)O- heterociclilo, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se ha descrito en el presente documento.
- 10 "Acilimino" se refiere a los grupos $\text{-C(NR}^*\text{)-R}^*$, donde cada R^* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.
- 15 "Aciliminoxi" se refiere a los grupos $\text{-O-C(NR}^*\text{)-R}^*$, donde cada R^* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.
- "Oxiacilimino" se refiere a los grupos $\text{-C(NR}^*\text{)-OR}^*$, donde cada R^* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.
- 20 "Cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos que tienen un solo anillo cíclico o varios anillos condensados, que preferentemente tienen incorporados de 3 a 8 átomos de carbono. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de un solo anillo sencillo tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclooctilo, y similares, o estructuras de múltiples anillos tales como adamantanilo y similares.
- 25 "Cicloalquenilo" se refiere a grupos alquenilo cíclicos que tienen un solo anillo cíclico y al menos un punto de insaturación interna, que tienen incorporados preferentemente de 4 a 8 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquenilo adecuados incluyen, por ejemplo, ciclobut-2-enilo, ciclopent-3-enilo, ciclohex-4-enilo, ciclooct-3-enilo y similares.
- 30 "Halo" o "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.
- "Heteroarilo" se refiere a un grupo heterocíclico aromático monovalente que cumple los criterios de Hückel de aromaticidad (es decir, contiene $4n + 2$ electrones π) y preferentemente tiene de 2 a 10 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno, selenio y azufre en el anillo (e incluye óxidos de azufre, selenio y nitrógeno). Dichos grupos heteroarilo pueden tener un solo anillo (por ejemplo, piridilo, pirrolilo o *N*-óxidos de los mismos o furilo) o múltiples anillos condensados (por ejemplo, indolizínilo, benzoimidazolilo, cumarinilo, quinolinilo, isoquinolinilo o benzotienilo).
- 35 40 "Heterociclilo" se refiere a un grupo saturado o insaturado monovalente que tiene un solo anillo o varios anillos condensados, preferentemente de 1 a 8 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno, azufre, oxígeno, selenio o fósforo en el anillo. Los más preferentemente, el heteroátomo es nitrógeno.
- 45 50 Los ejemplos de grupos heterociclilo y heteroarilo incluyen, pero sin limitación, oxazol, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, isotiazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno, tiazol, tiadiazoles, oxadiazol, oxatriazol, tetrazol, tiazolidina, tiofeno, benzo[b]tiofeno, morfolino, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofurano, triazol y similares.
- "Heteroarileno" se refiere a un grupo heteroarilo divalente en el que el grupo heteroarilo es como se ha descrito anteriormente.
- 55 "Heterociclileno" se refiere a un grupo heterociclilo divalente en el que el grupo heterociclilo es como se ha descrito anteriormente.
- 60 "Tio" se refiere a grupos H-S- , alquil-S- , cicloalquil-S- , aril-S- , heteroaril-S- y heterociclil-S- , donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se han descrito en el presente documento.
- "Tioacilo" se refiere a grupos H-C(S)- , alquil-C(S)- , cicloalquil-C(S)- , aril-C(S)- , heteroaril-C(S)- y $\text{heterociclil-C(S)-}$, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se han descrito en el presente documento.

"Oxitioacilo" se refiere a grupos HO-C(S)-, alquilO-C(S)-, cicloalquilO-C(S)-, arilO-C(S)-, heteroarilO-C(S)- y heterocicliO-C(S)-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se ha descrito en el presente documento.

5 "Oxitioaciloxi" se refiere a grupos HO-C(S)-O-, alquilO-C(S)-O-, cicloalquilO-C(S)-O-, arilO-C(S)-O-, heteroarilO-C(S)-O- y heterocicliO-C(S)-O-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se ha descrito en el presente documento.

10 "Fosforilamino" se refiere a los grupos -NR*-P(O)(R**)(OR***), donde R* representa H, alquilo, cicloalquilo, alqueno o arilo, R** representa OR*** o es hidroxilo o amino y R*** es alquilo, cicloalquilo, arilo o arilalquilo, donde alquilo, amino, alqueno, arilo, cicloalquilo y arilalquilo son como se ha descrito en el presente documento.

15 "Tioaciloxi" se refiere a grupos H-C(S)-O-, alquil-C(S)-O-, cicloalquil-C(S)-O-, aril-C(S)-O-, heteroaril-C(S)-O- y heterocicli-C(S)-O-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se ha descrito en el presente documento.

"Sulfinilo" se refiere a grupos H-S(O)-, alquil-S(O)-, cicloalquil-S(O)-, aril-S(O)-, heteroaril-S(O)- y heterocicli-S(O)-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se ha descrito en el presente documento.

20 "Sulfonilo" se refiere a grupos H-S(O)₂-, alquil-S(O)₂-, cicloalquil-S(O)₂-, aril-S(O)₂-, heteroaril-S(O)₂- y heterocicli-S(O)₂-, donde alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo son como se ha descrito en el presente documento.

25 "Sulfinilamino" se refiere a grupos H-S(O)-NR*-, alquil-S(O)-NR*-, cicloalquil-S(O)-NR*-, aril-S(O)-NR*-, heteroaril-S(O)-NR*- y heterocicli-S(O)-NR*-, donde R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

30 "Sulfonilamino" se refiere a grupos H-S(O)₂-NR*-, alquil-S(O)₂-NR*-, cicloalquil-S(O)₂-NR*-, aril-S(O)₂-NR*-, heteroaril-S(O)₂-NR*- y heterocicli-S(O)₂-NR*-, donde R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

35 "Oxisulfinilamino" se refiere a grupos HO-S(O)-NR*-, alquilO-S(O)-NR*-, cicloalquilO-S(O)-NR*-, arilO-S(O)-NR*-, heteroarilO-S(O)-NR*- y heterocicliO-S(O)-NR*-, donde R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

40 "Oxisulfonilamino" se refiere a grupos HO-S(O)₂-NR*-, alquilO-S(O)₂-NR*-, cicloalquilO-S(O)₂-NR*-, arilO-S(O)₂-NR*-, heteroarilO-S(O)₂-NR*- y heterocicliO-S(O)₂-NR*-, donde R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

45 "Aminotioacilo" se refiere a grupos R*R*N-C(S)-, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

50 "Tioacilamino" se refiere a grupos H-C(S)-NR*-, alquil-C(S)-NR*-, cicloalquil-C(S)-NR*-, aril-C(S)-NR*-, heteroaril-C(S)-NR*- y heterocicli-C(S)-NR*-, donde R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

55 "Aminosulfinilo" se refiere a grupos R*R*N-S(O)-, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

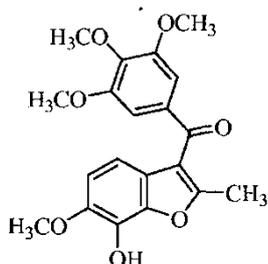
60 "Aminosulfonilo" se refiere a grupos R*R*N-S(O)₂-, donde cada R* es, de manera independiente, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y donde cada uno de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo es como se ha descrito en el presente documento.

65 En la presente memoria descriptiva, "opcionalmente sustituido" pretende significar que un grupo puede o no estar adicionalmente sustituido o condensado (para formar un grupo policíclico condensado) con uno o más grupos seleccionados entre hidroxilo, acilo, alquilo, alcoxi, alqueno, alquenoilo, alquenoilo, alquenoilo, alquenoilo, amino, aminoacilo, tio, arilalquilo, arilalcoxi, arilo, ariloxi, acilamino, ciano, halógeno, nitro, sulfuro, fosfeno, fosforilamino, fosfinilo, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclioxi, oxiacilo, oxima, éter de oxima, hidrazona, -NHC(NH)NH₂, oxiacilamino, oxisulfonilamino, aminoaciloxi, trihalometilo, trihaloalquilo, pentafluoroetilo, trifluorometoxi, difluorometoxi,

trifluorometanotio, trifluoroetenilo, mono- y di-alquilamino, mono- y di-(alquil sustituido)amino, mono- y di-arilamino, mono- y di-heteroarilamino, mono- y di-heterocicliclamino, y aminas disustituidas no simétricas que tienen diferentes sustituyentes seleccionados entre alquilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo, y similares.

5 Un grupo amino opcionalmente sustituido también puede incluir restos de aminoácidos y de péptidos.

De acuerdo con la invención, el TPI para su uso en la presente terapia de la combinación es un compuesto de fórmula (III), o una sal, un solvato o un profármaco del mismo:



10 El compuesto de fórmula (III) (2-metil-7-hidroxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano) se puede preparar mediante la metodología sintética descrita en el documento PCT/AU2007/000101 (WO 07/087684).

15 Se ha observado que los compuestos de fórmula III son potentes inhibidores de la polimerización de la tubulina (TPI). Un aspecto importante de los compuestos de fórmula III es la combinación de los sustituyentes C₆ y C₇ específicos con el grupo Q C₂ (especialmente, metilo C₂), que parece conferir una mayor potencia y selectividad en comparación con otros compuestos TPI estructuralmente relacionados. En estos compuestos, la selectividad no solo depende de la predisposición de la vasculatura del tumor hacia el colapso cuando se desafía con el VDA, sino también de la capacidad de un VDA para distinguir entre las células endoteliales tumorales y las células endoteliales normales. Las células endoteliales normales, que se encuentran en los tejidos sanos, están en estado de "reposo", y las células endoteliales tumorales se encuentran en un estado "activado". La mayoría de los VDA no distinguen entre estos dos estados, por ejemplo, la combretastatina A4 (CA4) es igualmente potente contra las células endoteliales en reposo y activadas. Sin embargo, los compuestos de fórmula III muestran selectividad hacia células endoteliales tumorales (activadas) frente a las células endoteliales normales (en reposo).

25 Se apreciará que los TPI y los compuestos de fórmula III se pueden administrar a un sujeto en forma de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico, o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácido acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, maleico, cítrico, láctico, místico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

30 Las sales básicas incluyen, pero sin limitación, las formadas con cationes farmacéuticamente aceptables tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio. En particular, la presente invención incluye dentro de su alcance sales catiónicas, por ejemplo, sales de sodio o de potasio, o alquilésteres (por ejemplo, metilo, etilo) del grupo fosfato.

35 También se apreciará que cualquier profármaco de éster de fosfato disódico de un compuesto de fórmula III también está dentro del alcance de la invención. El éster de fosfato disódico (en particular, un éster de fosfato disódico C₇ de un compuesto de fórmula III) del compuesto de la invención puede ser útil en el aumento de la solubilidad de los compuestos. Esto podría permitir, por ejemplo, la administración del compuesto en un vehículo benigno como solución salina. El éster de fosfato disódico se puede preparar de acuerdo con la metodología descrita en Pettit, G. R., *et al*, *Anticancer Drug Des.*, 1995, 10, 299. Otros textos que describen profármacos en general (y la preparación de los mismos) incluyen: "Design of Prodrugs", 1985, H. Bundgaard (Elsevier); "The Practice of Medicinal Chemistry", 1996, Camille G. Wermuth *et al.*, Capítulo 31 (Academic Press); y "A Textbook of Drug Design and Development", 1991, Bundgaard *et al.*, Capítulo 5, (Harwood Academic Publishers).

40 Los compuestos de fórmula III (o una sal o un profármaco de los mismos) pueden estar en forma cristalina bien como el compuesto libre o como un solvato (por ejemplo, hidrato), y se pretende que ambas formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación son conocidos en la técnica en general.

55

Componente (b) de la combinación; inhibidor de mTOR

mTOR es una serina/treonina quinasa intracelular implicada principalmente en el control del inicio de la traducción. La fosforilación dependiente de PI3K/Akt señala a través de la tuberina, el producto proteico del complejo TSC1/TSC2, que conduce a la activación de mTOR. mTOR fosforila posteriormente las dianas secuencia abajo, provocando el inicio de la traducción de las proteínas.

Por consiguiente, cualquier agente que inhiba la activación de mTOR, causando la regulación negativa de sus dianas secuencia abajo, queda englobado por el significado de "inhibidor de mTOR" como se usa en el presente documento.

El everolimus (Afinitor, RAD001, Certican) es un inhibidor de mTOR adecuado.

Enfermedades proliferativas

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad proliferativa" abarca ampliamente cualquier enfermedad neoplásica incluyendo aquellas que son potencialmente malignas (precancerosas) o malignas (cancerosas). Por lo tanto, la expresión abarca el tratamiento de tumores.

Por consiguiente, el término "tumor" se usa en general para definir cualquier crecimiento maligno de células cancerosas o precancerosas, y puede incluir leucemias y carcinomas tales como melanomas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer del SNC y cáncer renal, así como otros tipos de cáncer.

En una realización preferida, la combinación se puede usar en el tratamiento de tumores y, en particular, de los siguientes tumores: adenocarcinoma de mama, glioblastoma cerebral, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de células renales y carcinoma de células escamosas de faringe.

En un aspecto preferido, la invención proporciona una combinación de (a) y (b) para el tratamiento del cáncer renal, y, en particular, del carcinoma de células renales metastásico.

La combinación de (a) y (b)

Sin el deseo de quedar vinculados a teoría alguna, se cree que los componentes (a) y (b) funcionan en combinación para efectuar mejor la muerte de las células cancerosas. Como se ilustra en la Figura 1, se postula que el TPI induce la hipoxia/el estrés citotóxico en los tumores altamente vasculares, mientras que la inhibición de mTOR suprime concomitantemente las respuestas angiogénicas/de supervivencia impulsadas por HIF1a para producir un efecto aditivo o sinérgico beneficioso.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un uso para tratar tumores que comprende la administración de una cantidad eficaz de (a) un agente de dirección de tubulina de fórmula (III) mostrada anteriormente en combinación con una cantidad eficaz de (b) everolimus como un inhibidor de mTOR.

En realizaciones, se prefieren en particular las siguientes combinaciones:

Compuestos de fórmula III (o un profármaco de los mismos)	+	Everolimus	Cáncer renal
Compuestos de fórmula III (o un profármaco de los mismos)	+	Everolimus	Cáncer de ovario
Compuestos de fórmula III (o un profármaco de los mismos)	+	Everolimus	Cáncer de pulmón

En las realizaciones anteriores, preferentemente la forma de profármaco es el éster de fosfato disódico C₇ de un compuesto de fórmula III.

Una "cantidad eficaz" pretende significar que la cantidad de cada componente de la combinación, cuando se administra a un mamífero (en particular, a un ser humano) en necesidad de dicho tratamiento, es suficiente para efectuar el tratamiento para una determinada enfermedad proliferativa. Así pues, por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto componente (a) de la combinación (o una sal, un solvato o un profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo) es una cantidad suficiente para sinergizar o potenciar la actividad del inhibidor de mTOR (o viceversa) de manera que se reduzca o se alivie una enfermedad específica.

Esto puede incluir alcanzar, al menos parcialmente, el efecto deseado o retrasar la aparición de, o inhibir la progresión de, o detener o invertir por completo la aparición o la progresión de la enfermedad en particular (por ejemplo, del tumor) que se esté tratando.

Los estudios clínicos tales como los estudios de escalado de la dosis, abiertos, realizados en pacientes con enfermedades proliferativas pueden incluir los estudios para demostrar el sinergismo de los principios activos de la combinación. Los efectos beneficiosos y/o sinérgicos se pueden determinar directamente a través de los resultados de estos estudios que son conocidos como tales por los expertos en la materia. Estos estudios también permiten

5 comparar los efectos de una monoterapia en la que se usan los principios activos y una combinación de la invención. Preferentemente, la dosis del componente (a) de la combinación se puede escalar hasta alcanzarse la dosis máxima tolerada (MTD), y el agente (b) se administra como una dosis fija. Como alternativa, el componente (a) de la combinación se administra a una dosis fija y la dosis de agente (b) se escala. Cada paciente puede recibir dosis de agente (a) bien diariamente o de manera intermitente. En dichos estudios, se puede determinar la eficacia del

10 tratamiento, por ejemplo, después de 6, 12, 18 o 24 semanas mediante la evaluación de las puntuaciones de los síntomas cada 9 semanas.

La administración de la combinación farmacéutica de la presente invención puede resultar no solo en un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico aditivo o sinérgico, por ejemplo, con respecto a aliviar, retrasar la progresión de o inhibir los síntomas, sino también en efectos beneficiosos más sorprendente. Dichos otros efectos pueden incluir un menor número de efectos secundarios, una mejor calidad de vida o una disminución de la morbilidad, en comparación con una monoterapia en la que solo se aplica uno de los ingredientes farmacéuticamente activos usados en la combinación de la presente invención.

15

Un beneficio adicional de la invención es que se pueden usar dosis más bajas de los principios activos de la combinación. Las dosis no solo necesitan ser más bajas, sino que también se pueden aplicar con menor frecuencia, lo que puede reducir la incidencia o la gravedad de los efectos secundarios. El término "administración" se refiere a la administración conjunta de los componentes de la combinación a un solo paciente, y pretende incluir pautas de tratamiento en las que los agentes no se administren necesariamente por la misma vía de administración o al mismo

20 tiempo. Por consiguiente, los componentes (a) y (b) de la combinación se pueden administrar juntos, uno detrás del otro o por separado en una forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación unitarias separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija tal como una composición farmacéutica que comprenda tanto el componente (a) (o una sal, un solvato o un profármaco del mismo) como el componente (b).

25

En particular, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cada componente de la combinación de la invención simultánea o secuencialmente, y por cualquier orden, y los componentes se pueden administrar por separado o como una combinación fija.

30

Por ejemplo, el uso de tratamiento de enfermedades proliferativas de acuerdo con la invención puede comprender: (i) la administración del componente (a) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable; y (ii) la administración del componente (b) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, simultánea o secuencialmente por cualquier orden, en cantidades que conjuntamente son terapéuticamente eficaces, preferentemente en cantidades sinérgicamente eficaces, por ejemplo, a dosis diarias o intermitentes correspondientes a las cantidades descritas en el presente documento. Los componentes individuales de la combinación de la invención se pueden administrar por separado en diferentes momentos en el transcurso de la terapia o concurrentemente en formas de la combinación divididas o individuales. Además, el término administrar también abarca el uso de un profármaco de un componente de una combinación que se convierte *en vivo* en el componente de la combinación como tal. Por lo tanto, se entenderá que la presente invención abarca la totalidad de dichas pautas de tratamiento simultáneo o alterno, debiéndose interpretar el término "administrar" en consecuencia.

35

40

45

Como tal, se apreciará que los componentes de la combinación se pueden presentar como un "kit de piezas" para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa (por ejemplo, terapia de tumores). El kit puede comprender un envase donde se suministren los componentes de la combinación por separado para la administración conjunta con las instrucciones para su uso en la terapia en particular.

50

La dosis eficaz de cada uno de los componentes de la combinación empleados en la combinación de la invención puede variar dependiendo del compuesto o de la composición farmacéutica empleado en particular, del modo de administración, de la afección que se vaya a tratar, de la gravedad de la afección que se vaya a tratar. Por lo tanto, la pauta de dosificación de la combinación de la invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la vía de administración, y la función renal y hepática del paciente. Un médico con experiencia habitual puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de los principios activos individuales necesaria para aliviar, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

55

Como es evidente, las dosis diarias para los componentes (a) y (b) de la combinación variarán dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, del compuesto seleccionado, de la afección que se vaya a tratar en particular y del efecto deseado. En general, sin embargo, se logran resultados satisfactorios en la administración del agente (a) a dosis diarias de aproximadamente 0,05 a 20 mg/kg al día, particularmente de 1 a 20 mg/kg al día, por ejemplo, de 0,4 a 16 mg/kg al día, como una sola dosis o en dosis divididas. El componente (a) y el componente (b) de la combinación se pueden administrar por cualquier vía convencional, en particular, por vía enteral, por ejemplo, por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones bebibles; o parenteralmente, por ejemplo, en

60

65

forma de soluciones o suspensiones inyectables. Las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral comprenden de aproximadamente 0,02 a 50 mg de principio activo, normalmente de 0,1 a 30 mg y de 2 a 25 mg, de 4 a 20 mg, por ejemplo, de componente (a) o (b) de la combinación, junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

5 El componente (b) de la combinación se puede administrar a un ser humano en un intervalo de dosis diario de 0,5 a 1.000 mg. Las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral comprenden de aproximadamente 0,1 a 500 mg de principio activo, preferentemente de 5 a 50 mg/día, más preferentemente de 5 a 20 mg/día, y lo más preferentemente de aproximadamente 7 a 12 mg/día, junto con uno o más diluyentes o
10 vehículos farmacéuticamente aceptables. Los métodos y las pautas de administración para el suministro de los inhibidores de mTOR conocidos serían conocidos por el experto en la materia.

15 Por ejemplo, una pauta de administración puede incluir la adición del TPI (el compuesto de fórmula III) a un nivel de dosis asignado IV los días 1 y 8 (de un ciclo de 21 días), donde el inhibidor de mTOR se administra como una dosis diaria oral (por ejemplo, de aproximadamente 10 mg/día). En dicha realización, el compuesto de fórmula (III) se puede administrar a un nivel de entre 4 y 16 mg/m².

20 La administración de una combinación farmacéutica de la invención no solo produce un efecto beneficioso, por ejemplo, un efecto terapéutico aditivo o sinérgico, por ejemplo, con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, sino también otros efectos beneficiosos sorprendentes, por ejemplo, menos efectos secundarios, una mejor calidad de vida o una reducción de la morbilidad, en comparación con una monoterapia en la que solo se aplica uno de los ingredientes farmacéuticamente activos usados en la combinación de la invención.

25 Un beneficio adicional es que se pueden usar menores dosis de los principios activos de la combinación de la invención, por ejemplo, que las dosis no solo suelen necesitar ser más bajas, sino que también se aplican con menor frecuencia, o se pueden usar para reducir la incidencia de los efectos secundarios. Esto está de acuerdo con los deseos y las necesidades de los pacientes que se vayan a tratar.

30 Las combinaciones de los componentes (a) y (b) se pueden combinar, de manera independiente o conjuntamente, con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más adyuvantes farmacéuticos convencionales adicionales y administrarse por vía enteral, por ejemplo, por vía oral, en forma de comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, etc., o parenteralmente, por ejemplo, por vía intraperitoneal o intravenosa, en forma de soluciones o suspensiones inyectables estériles. Las composiciones enterales y parenterales se pueden preparar por medios convencionales.

35 Las composiciones farmacéuticas para la administración por separado del componente (a) y del componente (b) de la combinación o para la administración en una combinación fija (es decir, una composición) de acuerdo con la invención se pueden preparar de una manera conocida en la técnica, y son aquellas adecuadas para la administración enteral, tal como oral o rectal, y la administración parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), en particular, seres humanos, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un componente de la combinación farmacológicamente activo solo, por ejemplo, como se indica anteriormente, o en combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para la aplicación enteral o parenteral.

45 Las composiciones farmacéuticas adecuadas contienen, por ejemplo, del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 99,9 %, preferentemente del aproximadamente 1 % al aproximadamente 60 %, del/de los principio/s activo/s.

50 La composición puede contener cualquier vehículo, diluyente o excipiente adecuado. Estos incluyen todos los disolventes, medios de dispersión, cargas, vehículos sólidos, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes de penetración dérmica, tensioactivos, agentes isotónicos y de absorción, y similares convencionales. Se entenderá que las composiciones de la invención también pueden incluir otros agentes fisiológicamente activos complementarios.

55 El portador debe ser farmacéuticamente "aceptable" en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la composición y no perjudicial para el sujeto. Las composiciones incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica. Dichos métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el portador que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

65 Las composiciones de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sobres o comprimidos, conteniendo cada una cantidad predeterminada

del principio activo; en forma de un polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar en forma de un bolo, un electuario o una pasta.

5 Un comprimido se puede fabricar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma suelta tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclada con un aglutinante (por ejemplo, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio, polivinilpirrolidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se
10 pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados, y se pueden formular de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos se pueden proporcionar opcionalmente con un recubrimiento entérico, para proporcionar la liberación
15 en partes del intestino distintas del estómago.

Las composiciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen píldoras que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o goma de tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y
20 enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Las composiciones adecuadas para la administración tópica en la piel pueden comprender los compuestos disueltos o suspendidos en cualquier portador o base adecuado, y pueden estar en forma de lociones, gel, cremas, pastas, pomadas y similares. Los portadores adecuados incluyen aceite mineral, propilenglicol, polioxietileno,
25 polioxipropileno, cera emulsionante, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de cetilésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. También se pueden usar parches transdérmicos para administrar los compuestos de la invención.

Las composiciones para la administración rectal se pueden presentar en forma de un supositorio con una base adecuada que comprenda, por ejemplo, manteca de cacao, glicerina, gelatina o polietilenglicol.
30

Las composiciones adecuadas para la administración vaginal se pueden presentar en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contengan, además del principio activo, portadores conocidos en la técnica que sean apropiados.
35

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones estériles isotónicas acuosas y no acuosas para inyección que pueden contener antioxidantes, tampones, bactericidas y solutos que vuelven la composición isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en recipientes sellados
40 monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado criodesecado (liofilizado) que solo requiera la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, de agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y las suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

45 Las composiciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria, como se ha descrito anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Se ha de entender que, además de los principios activos mencionados anteriormente en particular, las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de composición en cuestión, por ejemplo, aquellos adecuados para la administración oral pueden incluir dichos agentes adicionales como aglutinantes, edulcorantes, espesantes, agentes aromatizantes, agentes disgregantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o agentes retardantes. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes disgregantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los
55 agentes aromatizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras, alcoholes grasos, zeína, goma laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, α -tocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito sódico. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Los agentes retardantes adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.
60

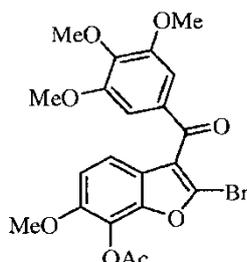
Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente.

A continuación, se describirán ciertas realizaciones de la invención con referencia a los siguientes ejemplos que solamente tienen el propósito de ilustrar, y no pretenden limitar el alcance de la generalidad descrita anteriormente en el presente documento.

5 Ejemplos

Protocolos sintéticos

Preparación de 2-Bromo-7-acetoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano



Etapa 1: 2-*t*-Butildimetilsilil-3-(*t*-butildimetilsililoximetilen)-6-metoxi-7-isopropoxibenzofurano (acoplamiento de Larock).

Se desoxigenó una suspensión de 2-isopropoxi-3-metoxi-5-yodofenol (4,41 mmol), 1-(*terc*-butildimetilsilil)-3-(*terc*-butildimetilsililoxi)propino (1,5 g, 5,28 mmol), cloruro de litio (189 mg, 4,45 mmol) y carbonato de sodio (2,34 g, 22,08 mmol) en dimetilformamida seca (5 ml) a 100 °C 4 veces por evacuación y volviendo a llenar con nitrógeno. Se añadió acetato de paladio (135 mg, 0,60 mmol) y se desgasificó el recipiente de reacción dos veces con nitrógeno. A continuación, se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 4 horas (tlc) y se retiró el disolvente por destilación al vacío. Se disolvió el residuo en acetato de etilo (75 ml), se agitó bien, se filtró y se trató con trietilamina (5 ml). Se concentró la solución sobre gel de sílice (10 g) y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, eluyente = hexano/éter dietílico/trietilamina; 95:5:1 %) , proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo (1,45 g, 96 %); RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,24(d, 1H, J = 8,45 Hz), 6,88 (d, 1H, J = 8,47 Hz), 4,80 (s, 2H, CH₂), 4,73 (m, 1H), 3,88 (s, 3H, OMe), 1,36 (d, 6H, J = 6,17 Hz), 0,94 (s, 9H), 0,92 (s, 9H), 0,35 (s, 6H), 0,12 (s, 6H).

Etapa 2: 2-*t*-Butildimetilsilil-3-formil-6-metoxi-7-isopropoxibenzofurano

A una solución de 2-*t*-butildimetilsilil-3-(*t*-butildimetilsililoximetilen)-6-metoxi-7-isopropoxibenzofurano (2,69 mmol) en metanol (100 ml), se añadió ácido clorhídrico concentrado (200 µl) y se agitó la reacción durante 30 minutos (monitorizada mediante tlc), se inactivó con trietilamina (2 ml) y se eliminó el disolvente por destilación al vacío. Se disolvió el residuo en diclorometano (20 ml), se lavó con agua (10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se concentró al vacío y se destiló junto con tolueno (20 ml). Se disolvió el producto en bruto en diclorometano seco (4 ml) y se añadió a una solución agitada de reactivo de Collin (trioxido de cromo (1,01 g), piridina (1,65 ml) en diclorometano seco (30 ml)). Se agitó la suspensión durante 10 minutos, se filtró y se lavó el residuo con éter dietílico (20 ml). Se concentró el filtrado sobre sílice (10 g) y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, eluyente = hexano/éter dietílico/trietilamina (90:9:1) , proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo claro (503 mg, 48 %); RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 10,25 (s, 1H, CHO), 7,79 (d, 1H, J = 8,45 Hz), 6,98 (d, 1H, J = 8,46 Hz), 4,65 (m, 1H), 3,89 (s, 3H, OMe), 1,35 (d, 6H, J = 6,17 Hz), 0,97 (s, 9H), 0,45 (s, 6H).

Etapa 3: 2-*t*-Butildimetilsilil-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxi-7-isopropoxibenzofurano

A una solución agitada de 3,4,5-trimetoxiyodobenceno (377 mg, 1,27 mmol) en tetrahidrofurano seco (1 ml) a -78 °C bajo nitrógeno, se añadió *n*-butillitio (795 µl, 1,59 mmol, solución 2 M en ciclohexano) y se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 40 minutos. Tras este tiempo, se añadió una solución de 2-*t*-butildimetilsilil-3-formil-6-metoxi-7-isopropoxibenzofurano (1,07 mmol) en tetrahidrofurano seco (1 ml) a la reacción gota a gota a través de una pipeta de jeringa. Se agitó la mezcla de reacción a -60 °C durante 20 minutos y luego se dejó calentar hasta 0 °C, se agitó durante 10 minutos, se inactivó con solución saturada de cloruro de amonio (2 ml) y se diluyó con acetato de etilo (20 ml). Se lavó la capa orgánica con agua (10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se retiró el disolvente al vacío, dando el residuo que se destiló junto con tolueno. Se disolvió el producto en bruto (908 mg) en tetrahidrofurano seco (10 ml) y se trató con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (900 mg, 1,59 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas (monitorizada mediante tlc) y luego se cargó sobre sílice (10 g) y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, eluyente = hexano/éter dietílico/trietilamina, 90:9:1), proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite amarillo claro (498 mg, 69 %); RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,14 (s, 2H, benzoil Hs), 6,81 (d, 1H, J = 8,64 Hz), 6,77 (d, 1H, J = 8,64 Hz)

4,74 (m, 1H), 3,93 (s, 3H, OMe), 3,86 (s, 3H, OMe), 3,78 (s, 6H, 2 x OMe), 1,39 (d, 6H, $J = 6,14$ Hz), 1,01 (s, 9H), 0,26 (s, 6H).

Etapa 4: 2-(*tert*-Butildimetilsililoxi)-7-acetoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano

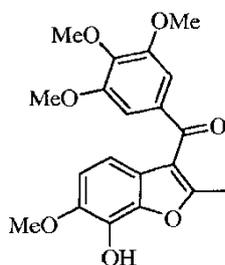
A una solución agitada de 2-(*t*-butildimetilsililoxi)-7-isopropoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxi-benzofurano (160 mg, 0,31 mmol) en DCM seco (2 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió tricloruro de aluminio sólido (83 mg, 0,62 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 15 minutos (monitorizada mediante tlc). Se inactivó la reacción con una solución saturada de cloruro de amonio, se extrajo con diclorometano y se secó sobre sulfato de magnesio. Se retiró el disolvente por destilación y se secó el residuo mediante la eliminación azeotrópica del agua con tolueno. Se disolvió el producto en bruto en piridina (2 ml), se añadió anhídrido acético (1 ml) y se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. Se destiló el disolvente al vacío, y se cargó el residuo sobre gel de sílice (1 g) y se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente, hexano:éter dietílico; 80:20) (134 mg, 84 %); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,14 (s, 2H, benzoil-Hs), 6,98 (d, 1H, $J = 8,72$ Hz), 6,85 (d, 1H, $J = 8,72$ Hz), 3,93 (s, 3H, OMe), 3,86 (s, 3H, OMe), 3,80 (s, 6H, 2 x OMe), 2,41 (s, 3H), 0,99 (s, 9H), 0,25 (s, 6H).

Etapa 5: 2-Bromo-7-acetoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano

A una solución agitada de 2-*t*-butildimetilsilil-7-acetoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano (120 mg, 0,44 mmol) en 1,2-dicloroetano (1 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno, se añadió bromo (12 μl , 0,44 mmol) gota a gota y se agitó la mezcla de reacción a esta temperatura durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se inactivó la reacción con solución saturada de tiosulfato de sodio, se extrajo con acetato de etilo (20 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se eliminó el disolvente por destilación al vacío. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía de columna de gel de sílice (eluyente = hexano:éter dietílico; 8:2-7:3), proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido cristalino incoloro (91 mg, 81 %); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,40 (d, 1H, $J = 8,70$ Hz), 7,14 (s, 2H, benzoil-Hs), 6,98 (d, 1H, $J = 8,75$ Hz), 3,94 (s, 3H, OMe), 3,89 (s, 3H, OMe), 3,86 (s, 6H, 2 x OMe), 2,43 (s, 3H); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 187,95 (CO), 167,71; 152,75; 149,54; 147,49; 142,59; 131,92; 131,80; 123,91; 121,84; 119,89; 117,72; 109,89; 106,92; 60,69; 56,61; 56,00; 20,09.

Ejemplo 1

Preparación de 2-Metil-7-hidroxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano



Preparación A

A una solución agitada de 2-bromo-7-acetoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxibenzofurano (20 mg, 0,042 mmol), ácido metilborónico (40 mg, 0,67 mmol), en 1,4-dioxano (2 ml) a 90 °C, se añadió tetraquis-trifenilfosfin-paladio (11 mg, 0,01 mmol) seguido de la adición de una solución de bicarbonato de sodio (40 mg, 0,48 mmol) en agua destilada (0,5 ml). Tras 5 minutos, la mezcla de reacción se volvió roja. Tras 2 horas (tlc), se llevó la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se añadió solución saturada de cloruro de amonio (2 ml) y se diluyó con diclorometano (20 ml). Se separó la capa orgánica y se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se retiró el disolvente por destilación al vacío. Se purificó el residuo mediante PTLC (eluyente = diclorometano/metanol, 1:1), dando el compuesto del título (el acetato se escindió durante la reacción) en forma de un sólido blanco esponjoso; (3 mg, 19 %).

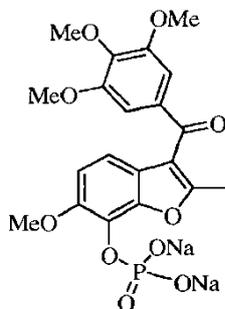
Preparación B (acoplamiento de Negishi)

A una solución agitada de bromuro de cinc (592 mg, 2,63 mmol) en THF seco (1,5 ml) a 0 °C, se añadió la solución de metil-litio (solución 1,6 M en éter dietílico, 2,6 ml, 4,15 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas. Se añadió 2-bromo-7-acetoxi-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6-metoxi-benzofurano (300 mg, 0,63 mmol) sólido y se eliminó el éter al vacío y, al resto de la suspensión, se añadió catalizador de diclorobis(trifenilfosfin)paladio (21 mg) y una cantidad catalítica de yoduro de cobre (I). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 36 horas (monitorizada mediante tlc), se inactivó con solución saturada de cloruro de amonio y se extrajo con diclorometano (10 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y se destiló el disolvente al vacío y se purificó el producto mediante

columna de gel de sílice (eluyente = hexano/acetato de etilo; 8:2). Se cristalizó el producto en metanol (106 mg, 46 %); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,09 (s, 2H, benzoil Hs), 6,93 (d, 1H, $J = 8,54$ Hz), 6,83 (d, 1H, $J = 8,56$ Hz), 5,70 (sa, 1H, OH), 3,93 (s, 3H, OMe), 3,92 (s, 3H, OMe), 3,83 (s, 6H, 2 x OMe), 2,54 (s, 3H, 2-Me).

5 Ejemplo 2

Preparación de 6-metoxi-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzofurano-7-il-fosfato disódico



10

Etapas 1: 6-Metoxi-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzofurano-7-il-fosfato dibencílico:

15

A una mezcla de 0,081 g (0,22 mmol) de (7-hidroxi-6-metoxi-2-metilbenzofurano-3-il)-(3,4,5-trimetoxifenil)metanona, 0,086 g (0,261 mmol) de tetrabromuro de carbono y 0,063 ml (0,283 mmol) de dibencilfosfita en 2,5 ml de acetonitrilo anhidro, se añadieron 0,046 ml de trietilamina anhidra gota a gota a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla resultante durante 2 h a temperatura ambiente, luego se diluyó hasta 20 ml con acetato de etilo, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se separó por filtración y se evaporó hasta la sequedad a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía de columna ultrarrápida (diclorometano/acetato de etilo, 9:1), dando el compuesto del título en forma de una espuma incolora (0,13 g, 94 %); RMN de ^1H (CDCl_3) δ 2,42 (s, 3H, Me-2); 3,83 (s, 1H, OMe); 3,93 (s, 3H, OMe); 5,33 (m, 4H, CH_2Ph); 6,89 (d, CH aromático, $J = 8,7$ Hz); 7,21 (dd, 1H, CH aromático, $J = 8,72$ Hz; $J = 1,2$ Hz); 7,08 (s, 2H, CH aromático); 7,29 - 7,43 (m, 10 H, CH aromático).

20

25

Etapas 2: 6-Metoxi-2-metil-3-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzofurano-7-il-fosfato disódico:

30

A una solución agitada de 0,122 g (0,193 mmol) del producto de la Etapa 1 en 1 ml de acetonitrilo anhidro, se añadieron 0,075 ml (0,58 mmol) de bromotrimetilsilano a - 5 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla resultante durante 1 h a 0 °C, y luego se evaporó hasta la sequedad al vacío. Se destiló el residuo hasta 5 ml con metanol anhidro y se llevó el pH de la solución hasta aproximadamente 10 mediante la adición de metóxido de sodio. Tras la evaporación de la mezcla resultante a presión reducida, se lavó el residuo sólido con isopropanol anhidro (4 x 1,5 ml) y etanol anhidro (3 x 1,5 ml) y se secó al vacío, dando 0,062 g (rendimiento del 65 %) del compuesto del título en forma de un sólido incoloro; RMN de ^1H (D_2O) δ 2,37 (s, 3H, Me-2); 3,76 (s, 6H, OMe); 3,79 (s, 3H, OMe); 3,82 (s, 3H, OMe); 4,66 (s, H_2O); 6,93 (d, 1H, CH aromático, $J = 8,6$ Hz); 7,04 (d, 1H, CH aromático, $J = 8,6$ Hz); 7,10 (s, 2H, CH aromático).

35

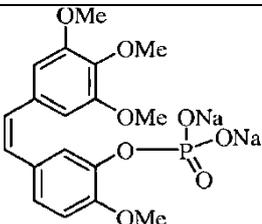
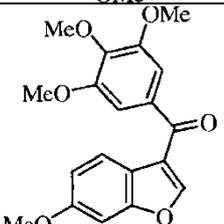
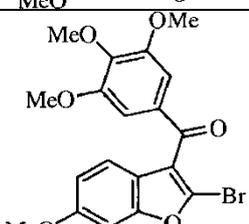
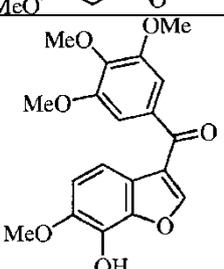
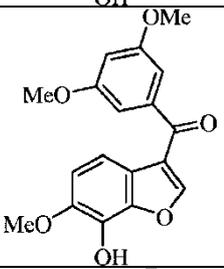
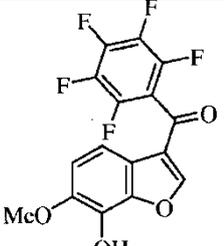
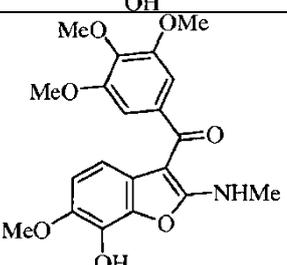
Datos biológicos

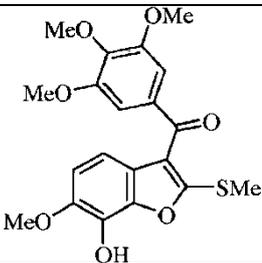
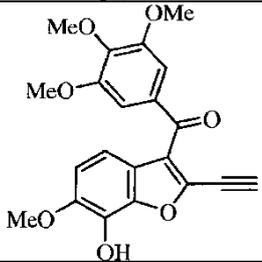
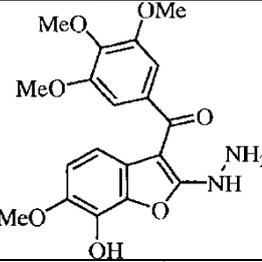
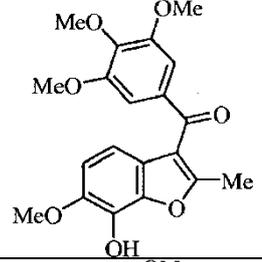
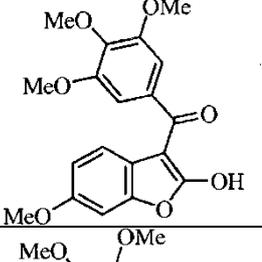
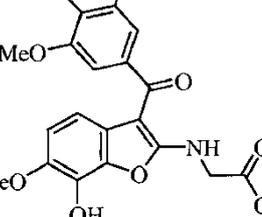
(A) (i) Estudios *in vitro* para el componente (a) de la combinación

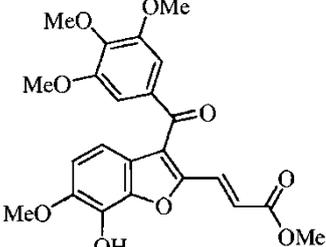
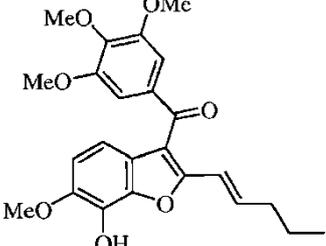
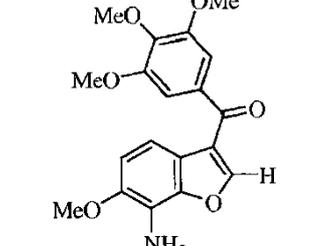
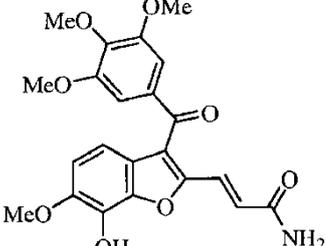
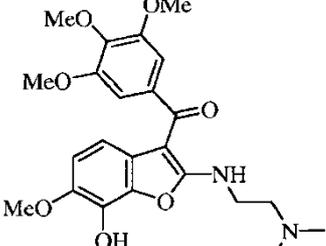
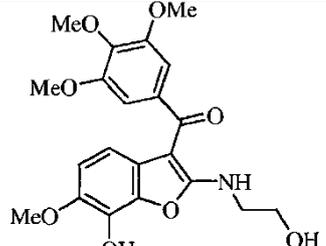
40

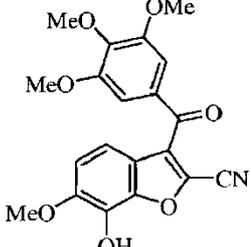
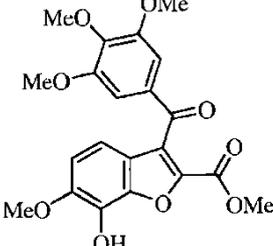
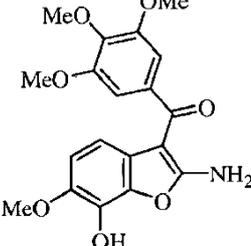
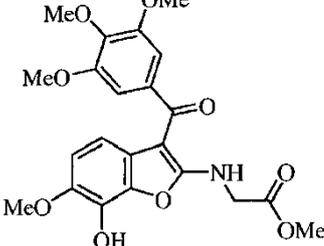
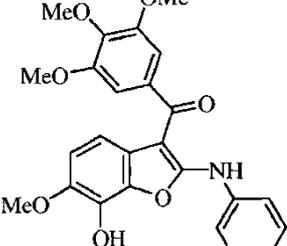
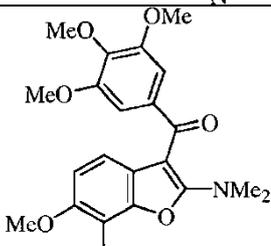
Tabla 1: Datos *in vitro* para los compuestos: estos son los resultados de los estudios de inhibición del crecimiento de los compuestos usando los ensayos de sulforrodamina B (SRB) o de recuento celular Systmex (CC). La CI_{50} es la concentración necesaria para inhibir el crecimiento celular neto en un 50 %.

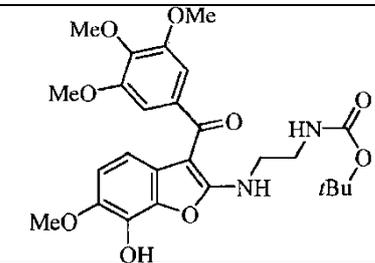
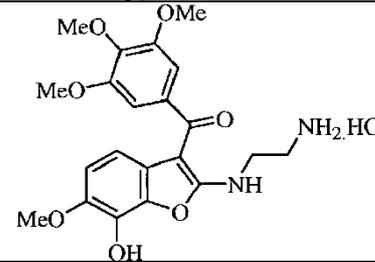
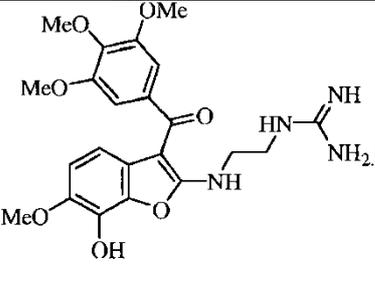
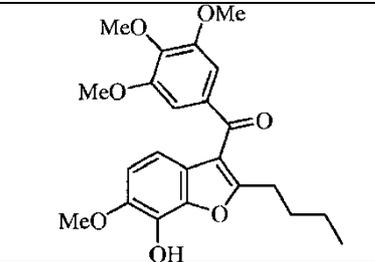
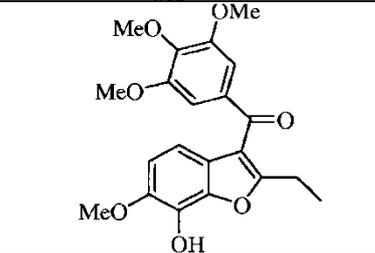
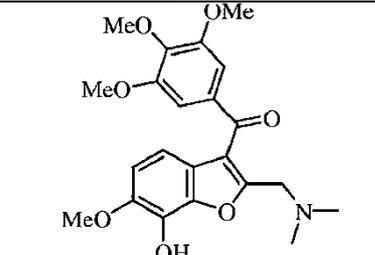
Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : CI_{50} , nM	HUVEC ^c Tum: CI_{50} , nM Norm: CI_{50} , nM
3		5	Tum: 1-10 Norm: 1-10

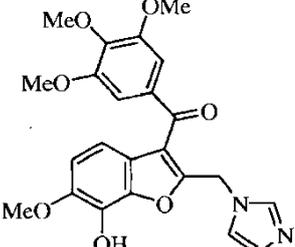
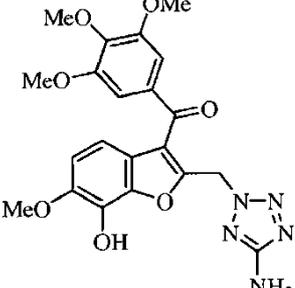
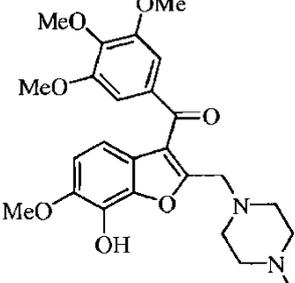
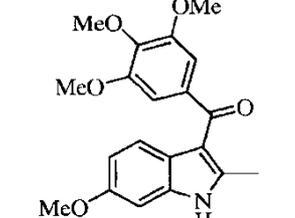
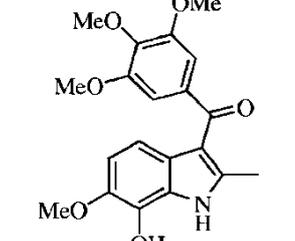
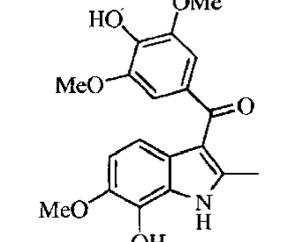
Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
4		5	Tum: 1-10 Norm: 1-10
5		55	Tum: 10-100 Norm: 10-100
6		500	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
7		45	Tum: 10-100 Norm: 10-100
8		35	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
9		800	Tum: >1000 Norm: >1000
10		3,5	Tum: 1-10 Norm: 0,1-1

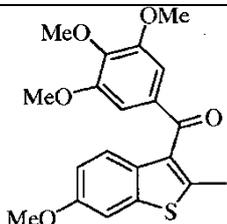
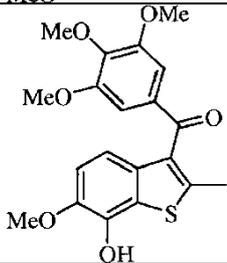
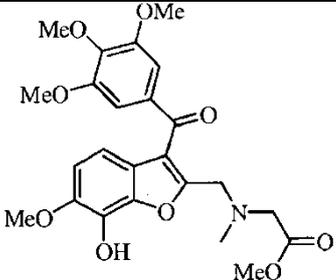
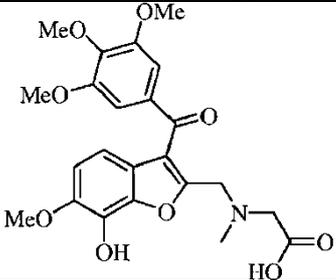
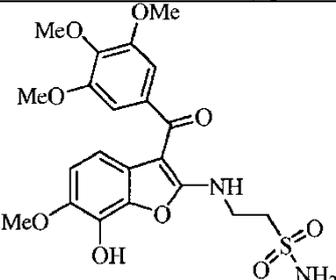
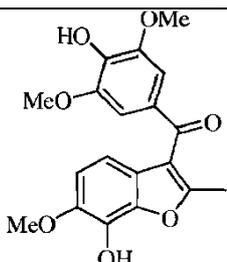
Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
11		1,2	Tum: 0,1-1 Norm: 1-10
12		3,3	Tum: 1-10 Norm: 1-10
13		35	Tum: 1-10 Norm: 10-100
14		2,0	Tum: 0,1-1 Norm: 10-100
15		575	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
16		260	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000

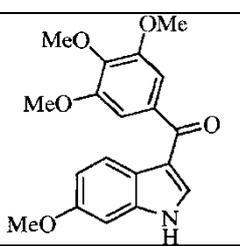
Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
17		2,0	Tum: 0,1-1 Norm: 1-10
18		8,0	Tum: 1-10 Norm: 1-10
19		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
20		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
21		10-100 ^b	Tum: 10-100 Norm: 10-100
22		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10

Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
23		0,1-1 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
24		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
25		0,1-1 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
26		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
27		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
28		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10

Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
29			Tum: 1-10 Norm: 1-10
30			Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
31			Tum: 100-1000 Norm: 10-100
32			Tum: 1-10 Norm: 1-10
33			Tum: 0,1-1,0 Norm: 0,1-1,0
34			Tum: 1-10 Norm: 1-10

Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
35			Tum: 1-10 Norm: 1-10
36			Tum: 1-10 Norm: 1-10
37			Tum: 10-100 Norm: 10-100
38			Tum: 0,1-1 Norm: 0,1-1
39			Tum: 0,01-0,1 Norm: 0,1-1
40			Tum: 1-10 Norm: 10-100

Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
41			Tum: 1-10 Norm: 1-10
42			Tum: 0,1-1 Norm: 1-10
43			Tum: 1-10 Norm: 1-10
44			Tum: 10-100 Norm: 10-100
45			Tum: 1-10 Norm: 1-10
46			Tum: 10-100 Norm: 100-1000

Ejemplo	Estructura	Línea celular cancerosa ^a : Cl ₅₀ , nM	HUVEC ^c Tum: Cl ₅₀ , nM Norm: Cl ₅₀ , nM
47			Tum: 1-10 Norm: 1-10
^a A menos que se indique lo contrario, la línea celular cancerosa es MCF-7. ^b La línea celular cancerosa es MDA-MB-231. ^c Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC); células endoteliales activadas de tipo tumoral (Tum) y células endoteliales de tipo inactivado normales (Norm).			

Descripción general de experimentos biológicos:

5 Ensayo de polimerización de la tubulina: se realizaron ensayos de inhibición de polimerización de la tubulina usando un kit de detección basado en fluorescencia (Nº BK011, Cytoskeleton) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió el compuesto de ensayo a una solución de 2 mg/ml de tubulina que contenía glicerol al 20 % y GTP 1 mM en 1 x tampón (tampón 1: sal de sesqui-sodio del ácido piperazin-*N,N'*-bis[2-etanosulfónico] 80 mM; cloruro de magnesio 2 mM; ácido etilenglicol-bis-(*b*-amino-etiléter)-*N,N,N',N'*-tetra-acético 0,5 mM, pH 6,9, indicador fluorescente 10 µM). Se midió la fluorescencia durante un período de 42 minutos a intervalos de 1 minuto. El aumento de la fluorescencia indica un aumento de la polimerización de tubulina. Existe un aumento de diez veces en la afinidad del indicador fluorescente por la tubulina polimerizada en comparación con las subunidades de tubulina monoméricas. El resultado es una señal de fluorescencia que sigue de cerca a la polimerización de la tubulina.

15 Ensayo de proliferación - endotelio quiescente: se sembraron células endoteliales de la vena umbilical humana (CC-2519, Clonetics) a 15.000 células/pocillo en EBM2 (CC-3156, Clonetics) + FBS al 0,5 % (CC-4101A, Clonetics) + GA-1000 (CC-4381A, Clonetics) en una placa de 96 pocillos por triplicado. Se cultivaron las células durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se sustituyó posteriormente el medio con medio recién preparado que incluía el compuesto o control negativo. Se cultivaron las células durante un período de 48 h. Se realizó un ensayo de MTT para medir los cambios en el número de células. En resumen, se añadieron 20 µl de reactivo MTT a las células que contenían 100 µl de EBM2 + FBS al 0,5 % y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Se midió la absorbancia a 492 nm.

25 Ensayo de proliferación - endotelio activado: se sembraron células endoteliales de la vena umbilical humana (CC-2519, Clonetics) a 2.500 células/pocillo en EGM2 (CC-3162, Clonetics) en una placa de 96 pocillos por triplicado. Se cultivaron las células durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se sustituyó posteriormente el medio con medio recién preparado que incluía el compuesto o control negativo. Se cultivaron las células durante un período de 48 h. Se realizó un ensayo de MTT para medir los cambios en el número de células. En resumen, se añadieron 20 µl de reactivo MTT a las células que contenían 100 µl de EGM2 y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Se midió la absorbancia a 492 nm.

30 (ii) Estudios *in vivo* para el componente (a) de la combinación

35 Ensayo de alteración vascular: para este estudio, se usaron ratones BALB/*c-nu/nu* atímicos hembra (ratón desnudo). Los ratones tenían entre 6-8 semanas de vida, y se adquirieron en el Animal Resource Centre, Perth, Australia occidental, permitiendo que se aclimataran durante un par de días. Todos los animales fueron alojados en condiciones libres de patógenos y se cuidaron de acuerdo con las directrices de Flinders University of South Australia y NH&MRC y el código australiano de prácticas para el cuidado y uso de animales con fines científicos. Se dejó crecer el cáncer de mama humano MDA MB 231 como xenoinjertos ortotópicos en la capa de grasa mamaria de ratones desnudos. Se inyectaron a cada ratón 2 x 10⁶ células en 50 µl de PBS de Dulbecco por vía subcutánea justo encima de la capa de grasa mamaria, por debajo de la extremidad delantera derecha. Se seleccionaron los tumores para el tratamiento cuando alcanzaron un diámetro de 100-150 mm³ (3 semanas después del implante). Se disolvió el compuesto de ensayo (Ejemplo 2) en solución salina y se inyectó por vía intravenosa a concentraciones que variaron de 150 mg/kg a 1 mg/kg en un volumen total de 400 µl. Se inyectaron por vía intravenosa a los animales portadores de tumores 10 mg/kg de Hoechst 33342, 24 horas después de la inyección del compuesto de ensayo. Se sacrificaron los animales 1 minuto después de la inyección de Hoechst 33342. Se recuperaron los tumores para su análisis histoquímico. Se realizó un análisis de perfusión tumoral evaluando la cantidad de tinción de Hoechst 33342 a lo largo de una sección transversal tumoral completa. Se observaron secciones de 10 micrómetros de biopsias tumorales congeladas bajo un filtro de luz ultravioleta. Usando una lente de objetivo 4x, se capturaron imágenes monocromáticas sucesivas de 8 bits, representando la superficie total de la sección tumoral. Se generaron imágenes de compuesto de la sección tumoral total superponiendo las zonas comunes de las imágenes monocromáticas. Se realizó la tinción con hematoxilina y eosina-Y de la misma sección tumoral para

identificar las regiones no tumorales. Se mapearon regiones no tumorales sobre imágenes de compuesto de Hoechst 33342, y se excluyeron del análisis de cuantificación. Se realizó la cuantificación midiendo la superficie en píxeles de la tinción por Hoechst 33342 y la superficie en píxeles total de la región tumoral. Se expresó la perfusión como un porcentaje de la superficie teñida de Hoechst 33342 con respecto a la superficie tumoral total (véase la Figura 4).

Inhibición del crecimiento tumoral: se trataron ratones Balb/C *nu/nu* portadores de tumores ortotópicos sólidos MDA-MB-231 con el compuesto del Ejemplo 29 a 40 mg/kg. Se administró i.v. a los animales un total de dos ciclos de tratamiento con el Ejemplo 2. Cada ciclo se administró en días y 8 seguido de un período sin administración de tres semanas. Se muestra el crecimiento tumoral representado como una proporción con respecto al volumen tumoral inicial durante un total de 72 días.

Se monitorizaron el crecimiento tumoral, así como la salud de los animales durante un máximo de 72 días después del día 1 del tratamiento. Los resultados observados en este experimento (véase la Figura 5) muestran claramente la inhibición del crecimiento tumoral en los animales tratados con dos ciclos del Ejemplo 2. Se observaron diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre los animales tratados con el Ejemplo 2 (n = 64) y los tratados con vehículo (n = 20) ya en el día 4 (p < 0,001; prueba de la t no pareada; análisis Prism®) hasta el día 70.

(B) (i) Estudios *in vitro* para las combinaciones de (a) y (b)

La evaluación preclínica de los agentes VDA de dirección a la tubulina ha demostrado que estos compuestos son capaces de interrumpir el flujo sanguíneo del tumor, aumentar la hipoxia del tumor y la necrosis. Estos efectos producen cierta reducción del crecimiento tumoral en modelos animales. La recuperación del tumor del daño vascular causado por la acción de VDA se produce en el transcurso de las 48 horas posteriores al tratamiento. Por otra parte, la alteración vascular prescinde del borde celular externo de una masa tumoral que parece estar mantenida por los vasos normales que rodean la cápsula del tumor y no se ve afectada por la acción de VDA. Es razonable plantear la hipótesis de que su borde viable mantenga posteriormente la revascularización del tumor y la recuperación de la acción del agente VDA. Los presentes inventores tienen la hipótesis de que la recuperación de los tumores de los efectos de la acción del VDA es impulsada por vías moleculares que mantienen la supervivencia de las células cancerosas y la inducción de la angiogénesis. Se realizó una serie de análisis histológicos para evaluar el daño causado por el Ejemplo 2 sobre la integridad de los componentes del microambiente del tumor y obtener información sobre la regulación positiva de las proteínas que son propensas a participar en la recuperación de los tumores. Dichos análisis incluyeron la evaluación de la expresión de VEGF, mTOR fosforilada, factor-1- α inducible por hipoxia (Hif-1 α) y factor-2- α inducible por hipoxia (Hif-2 α), el nivel de la apoptosis, la integridad de las células endoteliales y la proteína laminina de la membrana basal. Las observaciones de los presentes inventores demuestran que 24-30 h después del tratamiento con el Ejemplo 2, se produce una reducción de la tinción con el marcador de células endoteliales y CD31, lo que demuestra la destrucción de las células endoteliales tumorales y una considerable reducción de la tinción de laminina, lo que evidencia la degradación de la integridad de la membrana basal. Además, dichos análisis mostraron un aumento significativo del número de células apoptóticas en el tumor. Lo más importante es que se hizo evidente un aumento drástico en la tinción con el anticuerpo VEGF anti-humano. Se observa un aumento de la expresión de mTOR fosforilada (ser 2448), Hif-1 α y Hif-2 α alrededor de la región de borde viable como se indica por las flechas y la pérdida de células endoteliales en la zona necrótica (como se indica por la flecha en la Figura 3) en los tumores tratados con el Ejemplo 2.

El hallazgo novedoso de la regulación positiva de mTOR fosforilada en el borde viable que rodea las regiones tumorales necróticas inducidas por el Ejemplo 2 da lugar a la hipótesis actual de que el tratamiento de la combinación del Ejemplo 2 (y similares, agentes TPI) con inhibidores de la proteína mTOR se sinergizará en el suministro de un efecto prolongado de insuficiencia vascular, exponiendo el tumor a períodos más largos de hipoxia y generando una mayor supresión del crecimiento del tumor.

Además, la propiedad inherente de los agentes de dirección a la tubulina para suprimir la proliferación de las células cancerosas proporciona un mecanismo anticancerígeno secundario para esta clase de agentes. Los presentes inventores han demostrado que el tratamiento de combinación de una serie de líneas celulares con el Ejemplo 2 y el inhibidor de mTOR temsirolimus produce efectos aditivos en la supresión de la proliferación de la línea celular cancerosa *in vitro*. Además de su papel demostrado en la inducción de la angiogénesis, mTOR también es un factor clave del metabolismo y la supervivencia de las células cancerosas. Los inhibidores de mTOR inducen la citostasis, y varios han sido aprobados para su uso clínico en una serie de escenarios de cáncer. Por lo tanto, es probable que la dirección concurrente de la tubulina y mTOR produzca un mayor beneficio terapéutico.

El modo doble de posible compatibilidad terapéutica de mTOR con los agentes TPI mediante la interrupción del soporte vascular del tumor y directamente a través de la supresión de la proliferación de las células cancerosas es exclusivo de la clase de compuestos de dirección a la tubulina TPI. Por el contrario, los agentes que no son TPI con actividad VDA como, por ejemplo, DMXAA o ASA404 (ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético) no ejercen una acción antiproliferativa directa sobre las células cancerosas.

Análisis inmunohistoquímico - Método (Figura 3)

Se inyectó s.c. a ratones BALB/c nu/nu hembra a las 6 a 8 semanas la línea de células cancerosas humanas Caki-1 representante del cáncer renal. Se volvieron a suspender las células en PBS de Dulbecco (Sigma-Aldrich) y se inyectaron 5×10^6 células s.c. Se dejaron crecer los tumores hasta un tamaño medio de 700 mm^3 antes del tratamiento. El tratamiento con el Ejemplo 2 consistió en una sola inyección i.v. a un nivel de dosis de 32 mg/kg. Se incluyó el tratamiento con solución salina como un control de vehículo. Se sacrificaron los animales y se extirparon los tumores para su examen histológico 24 horas después de la administración. Se prepararon criosecciones de tumores y se sondaron con mTOR fosforilada (ser 2448), Hif-1 α , Hif-2 α y anticuerpos específicos de CD31. La tinción de los anticuerpos se visualizó usando 3,3'-diaminobencidina (manchas marrones) y las secciones se tiñeron por contratinción con hematoxilina Myers.

Evaluación de la combinación del Ejemplo 2 con inhibidores de mTOR usando un ensayo de proliferación *in vitro*

Se usaron líneas de células cancerosas humanas para evaluar los agentes adecuados para combinarse con el Ejemplo 2.

El análisis se basó en mediciones de la proliferación celular *in vitro* en presencia de los compuestos sometidos a evaluación. Se sembraron las células a una media de 500-2.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos donde se había permitido la adherencia durante la noche previa a la adición de los compuestos de ensayo. Se evaluó la proliferación celular después de 48-72 h de cultivo en presencia de las sustancias de ensayo. Se trataron las células con una combinación del Ejemplo 2 y el compuesto sometido a evaluación, o con cada uno de estos agentes solos. Se llevaron a cabo mediciones de la proliferación mediante un ensayo colorimétrico basado en tetrazolio (MTS). Se midieron las células metabólicamente activas usando CellTiter 96[®] Aqueous One Solution (Promega Corp. Madison WI, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tomaron las lecturas de absorbancia a 492 nm. Se normalizaron las lecturas de absorbancia para cada concentración de compuesto con respecto a los cultivos de control de vehículo correspondientes. Se ajustó una curva de respuesta a la dosis sigmoideal a los datos, y se calculó la concentración a la que la proliferación se redujo en un 50 % usando el programa informático Graph Pad Prisma 4 (San Diego, EE.UU.).

Valores de índice de combinación

Se usaron líneas de células cancerosas humanas (líneas celulares enumeradas: Caki-1, A498, Calu-6, SKOV-3, A4549) para evaluar los tratamientos de la combinación *in vitro*. Se trataron las células simultáneamente con el Ejemplo 2 y temsirolimus durante 72 horas, y se analizaron los datos de DE₅₀ y DE₇₅ de ambos agentes individualmente y en combinación usando el programa informático cuantitativo Calcsyn para determinar el índice de combinación (IC), y se clasificaron los efectos como combinación de beneficio sinérgico, aditivo o no aditivo (Chou T. C. "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies". *Pharmacol Rev.* Septiembre de 2006; 58(3):621-81). Los resultados se tabulan en la Figura 2.

Cultivo de células y líneas celulares

Las líneas de células cancerosas incluían Calu-6, A549, A498, Caki-1 y Sk-OV-3 (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Las células Calu-6 se cultivaron en medio MEM (Gibco[®]) con FCS al 10 %, penicilina-estreptomicina-glutamina 2 mM (Gibco[®]), solución tamponada con Hepes 10 mM (Gibco[®]), solución de piruvato de sodio 1 mM (Gibco[®]) y solución de aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Gibco[®]). Las células SK-OV-3 se cultivaron en medio DMEM/F12 (Gibco[®]) con FCS al 10 %, penicilina-estreptomicina-glutamina 2 mM y solución tamponada con Hepes 10 mM. Las células A549 se cultivaron en medio F12K (Gibco[®]) con FCS al 10 % y penicilina-estreptomicina-glutamina 2 mM. Las células A498 se cultivaron en medio MEM (Gibco[®]) con FCS al 10 % y penicilina-estreptomicina-glutamina 2 mM. Las células Caki-1 se cultivaron en medio McCoys 5a (Gibco[®]) con FCS al 0 % y penicilina-estreptomicina-glutamina 2 mM.

Evaluación de la combinación del Ejemplo 2 con inhibidores de mTOR usando un ensayo (ratones) *in vivo*

Se inoculó s.c. a ratones BALB/c nu/nu hembra a las 6 a 8 semanas la línea de células humanas Caki-1 derivada de un cáncer renal para establecer tumores sólidos. Se dejaron crecer los tumores hasta un tamaño medio de 150 mm^3 antes de comenzar el tratamiento. Se midió el volumen del tumor (en milímetros cúbicos) de dos a tres veces por semana. Se administró i.v. a los animales el Ejemplo 2 a 32 mg/kg el día 1 y el día 8 del ciclo de 28 días y/o se administró i.p. rapamicina a 1 mg/kg el día 2 y el día 5 de un ciclo semanal. Durante el estudio, se monitorizó el crecimiento tumoral y la salud de los animales.

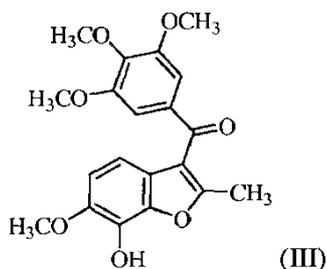
El crecimiento del tumor se representa como el volumen medio del tumor en mm^3 y se representa hasta el punto temporal en el que hasta el 90 % de los animales tratados con vehículo siguen vivos. La supervivencia se muestra como un porcentaje de los animales que todavía están vivos, y los datos se muestran hasta la finalización del estudio.

ES 2 545 340 T3

Se observa una tendencia hacia la reducción del volumen del tumor (Figura 6) y el aumento de la supervivencia (Figura 7) en el grupo de terapia de combinación (Ejemplo 2 + rapamicina) en comparación con las monoterapias solas (Ejemplo 2 o rapamicina) o el control de vehículo con esta pauta de los agentes.

REIVINDICACIONES

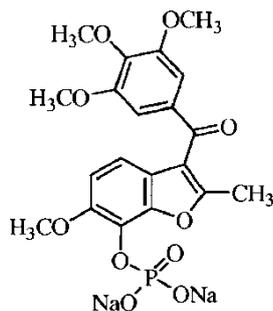
1. Una combinación farmacéutica que comprende: (a) un inhibidor de la polimerización de la tubulina y (b) un inhibidor de mTOR para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en la que el inhibidor de la polimerización de la tubulina es un compuesto de fórmula (III):



o una sal, un solvato o un profármaco de éster de fosfato disódico del mismo, y el inhibidor de mTOR es everolimus.

2. Combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad neoplásica es cáncer.

3. Combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el compuesto de fórmula (III) es un compuesto de fórmula:

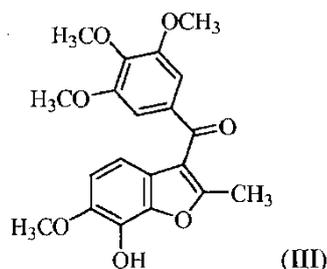


4. Combinación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la enfermedad neoplásica se selecciona entre cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

5. Combinación para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la enfermedad neoplásica es cáncer renal.

6. Combinación para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la enfermedad neoplásica es cáncer de mama.

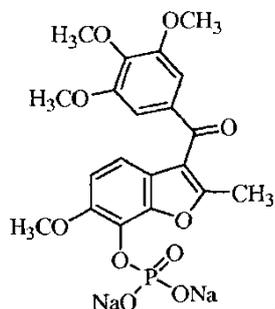
7. Uso de una cantidad eficaz de (a) un inhibidor de la polimerización de la tubulina y (b) un inhibidor de mTOR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neoplásica, en la que el inhibidor de la polimerización de la tubulina es un compuesto de fórmula (III):



o una sal, un solvato o un profármaco de éster de fosfato disódico del mismo, y el inhibidor de mTOR es everolimus.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la enfermedad neoplásica es cáncer.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que el compuesto de fórmula (III) es un compuesto de fórmula:



- 5 10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la enfermedad neoplásica se selecciona entre cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de mama o cáncer de pulmón.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad neoplásica es cáncer renal.
- 10 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad neoplásica es cáncer de mama.
13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el (a) TPI y el (b) inhibidor de mTOR se van a administrar por separado.
- 15 14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que el (a) TPI y el (b) inhibidor de mTOR se van a administrar secuencialmente.

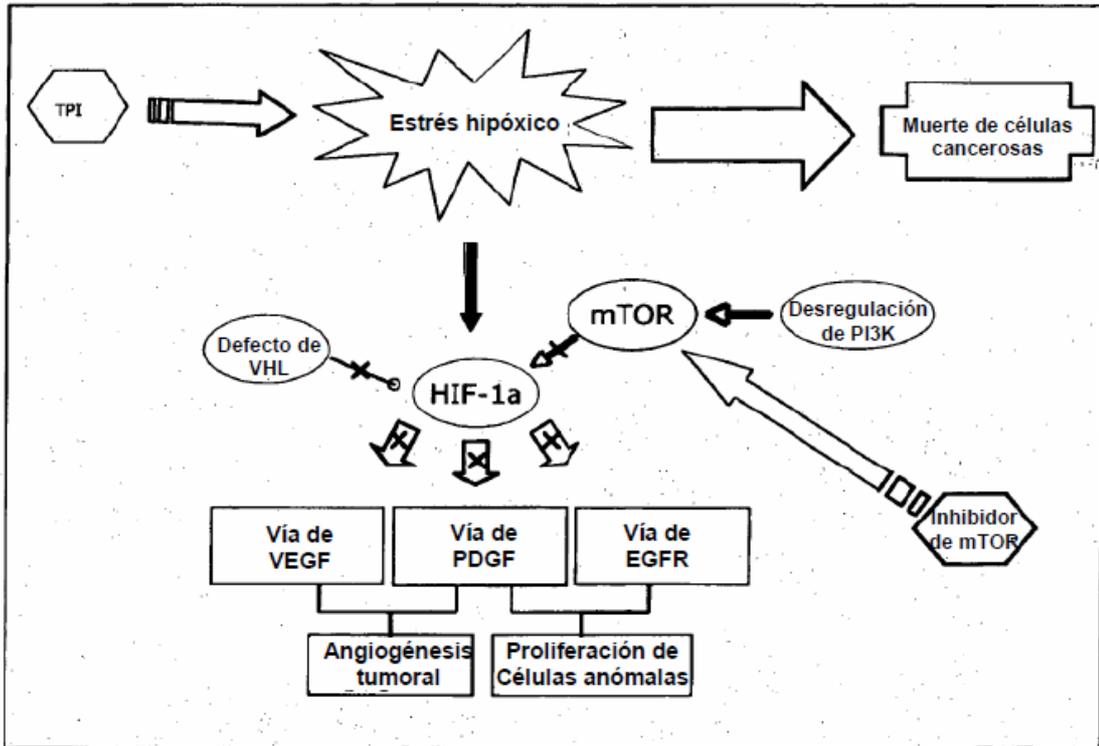


FIGURA 1

LINEA CELULAR	Indicación	Temsirrolimus	
		DE ₅₀	DE ₇₅
Caki-1	Riñón, Carcinoma de células claras	0,719	1,059
A498	Riñón, carcinoma	0,845	0,442
Calu-6	Pulmón, carcinoma anaplásico	0,782	0,765
A4549	Carcinoma de pulmón	0,785	0,887
SK-OV-3	Adenocarcinoma de ovario	0,965	0,986

CI = 0,1-0,9 Sinérgico

CI = 0,9-1,1 Aditivo

CI => Sin beneficio aditivo

FIGURA 2

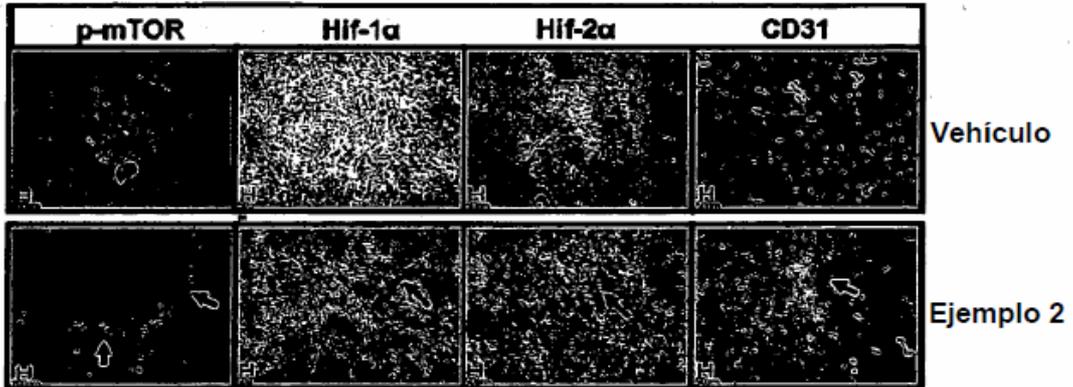


FIGURA 3

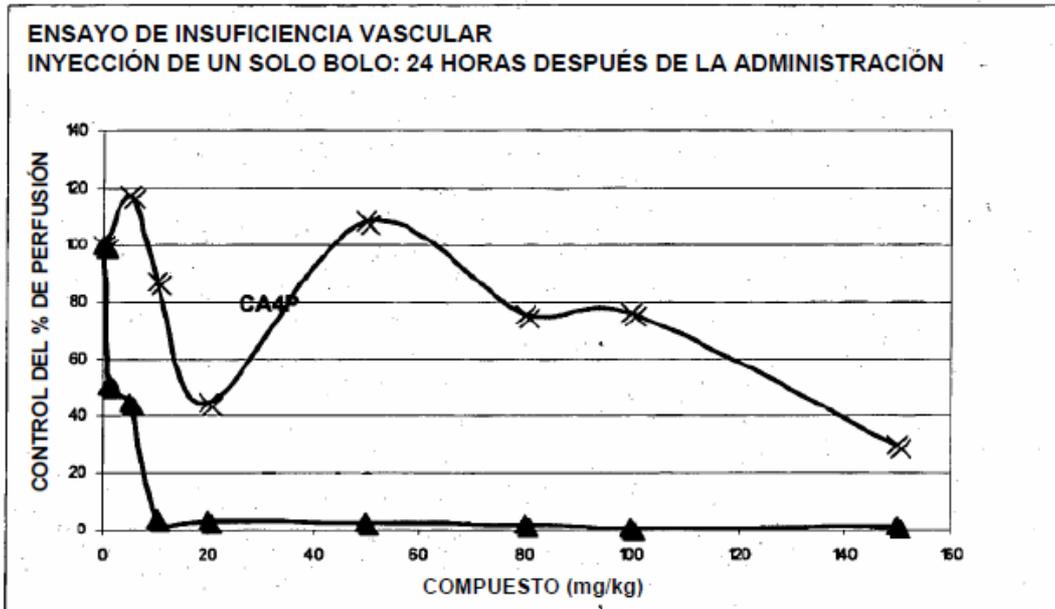


FIGURA 4

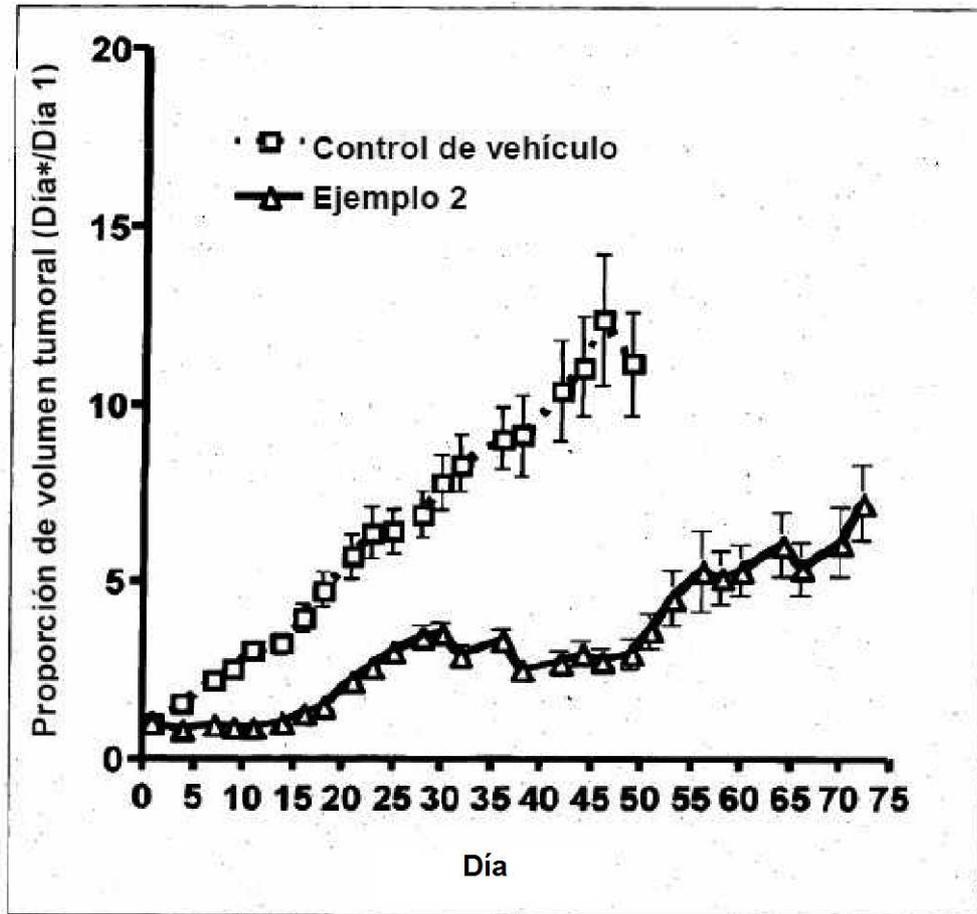


FIGURA 5

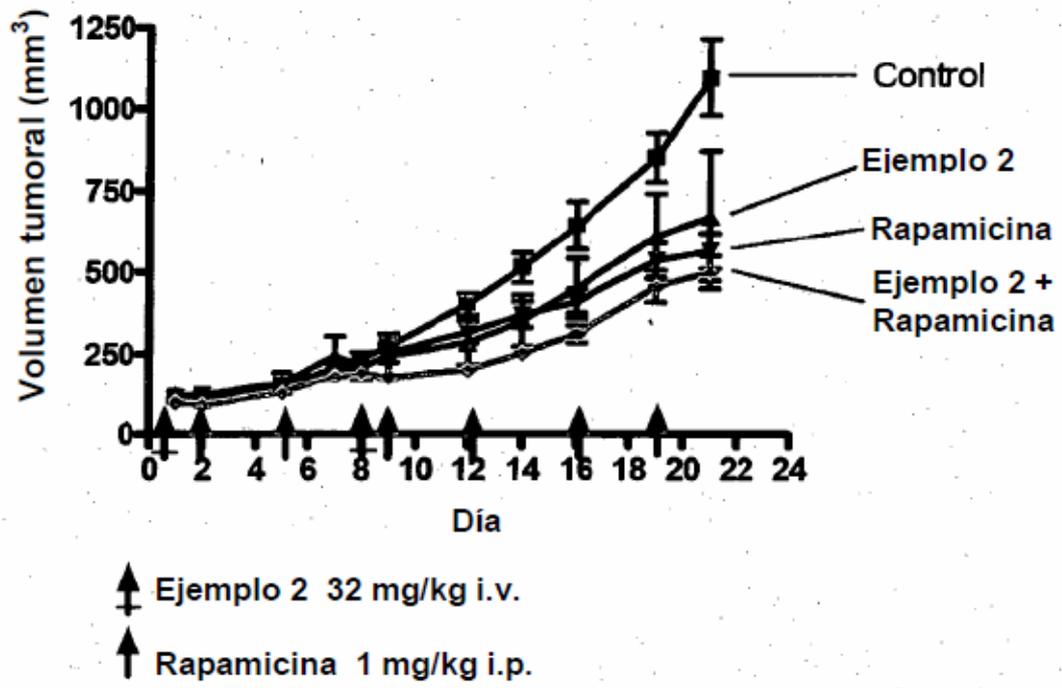


FIGURA 6

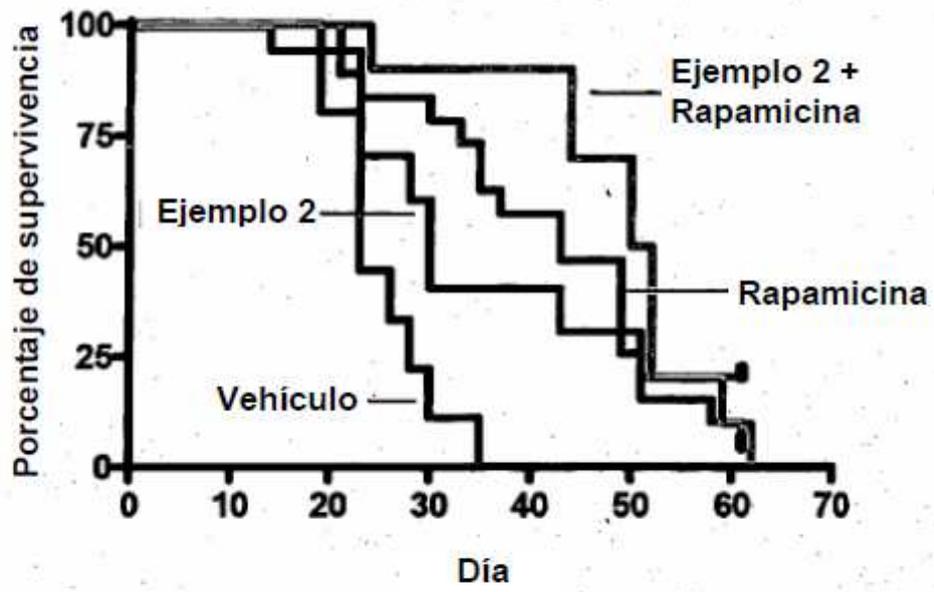


FIGURA 7