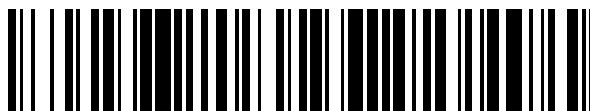


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 515**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2011** **E 11798224 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2586443**

54 Título: **Agente antitumoral que emplea compuestos con efecto inhibitorio de cinasas combinados**

30 Prioridad:

08.12.2010 JP 2010273921

25.06.2010 JP 2010145030

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

08.06.2016

73 Titular/es:

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP

72 Inventor/es:

NAKAGAWA, TAKAYUKI;
MATSUSHIMA, TOMOHIRO y
FUNAHASHI, YASUHIRO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 573 515 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).

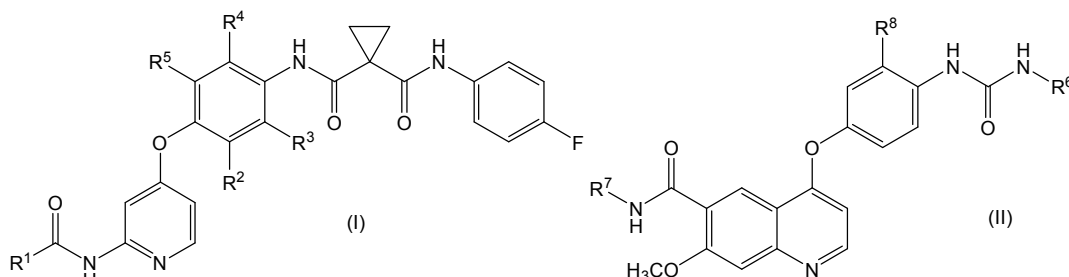
DESCRIPCIÓN

Agente antitumoral que emplea compuestos con efecto inhibitorio de cinasas combinados

Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente antitumoral para el uso combinado de compuestos con un efecto inhibitorio de cinasas. En particular, la presente invención se refiere a un agente antitumoral para el uso combinado de un compuesto con un efecto inhibitorio de HGFR y un compuesto con un efecto inhibitorio de múltiples tirosina-cinasas.

Antecedentes de la técnica



donde R^1 es azetidino, R^2 - R^5 son un átomo de hidrógeno o un átomo halógeno, R^6 es cicloalquilo C_{3-8} , R^7 es un átomo de hidrógeno, y R^8 es un átomo halógeno.

El compuesto representado por la Fórmula (I) presenta efectos inhibitorios potentes contra el receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGFR) y, por lo tanto, es útil como agente antitumoral, inhibidor de la angiogénesis e inhibidor de la metástasis tumoral (referencia 1 de la bibliografía de patentes). Se sabe que HGFR se sobreexpresa en un gran número de células tumorales (referencia 1 de la bibliografía no relacionada con patentes) y participa en la alteración maligna de tumores. Además, HGFR también se expresa en células endoteliales vasculares y se considera que provoca la proliferación de tumores al fomentar la angiogénesis (referencia 2 de la bibliografía no relacionada con patentes).

Por otra parte, el compuesto representado por la Fórmula (II) presenta acciones antiangiogénicas (referencia 2 de la bibliografía de patentes), efectos inhibitorios (referencias 3-6 de la bibliografía de patentes) contra tirosina-cinasas que se sabe que participan en la alteración maligna de tumores (referencias 3-5 de la bibliografía no relacionada con patentes); y se sabe que es un agente terapéutico para varios tumores tales como el cáncer de la tiroides, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de endometrio, cáncer gástrico y cáncer de vejiga.

En general, los agentes antitumorales no suelen ser eficaces para todos los pacientes cuando se utilizan de forma individual. Por ello, hasta la fecha se ha tratado de incrementar la tasa de curación en varias ocasiones combinando una pluralidad de agentes antitumorales (referencias 7-9 de la bibliografía de patentes).

Lista de citas

Bibliografía de patentes

Referencia 1 de la bibliografía de patentes: WO 2007/023768
Referencia 2 de la bibliografía de patentes: WO 2002/032872
Referencia 3 de la bibliografía de patentes: WO 2004/080462
Referencia 4 de la bibliografía de patentes: WO 2007/061130
Referencia 5 de la bibliografía de patentes: WO 2007/136103
Referencia 6 de la bibliografía de patentes: WO 2008/026748
Referencia 7 de la bibliografía de patentes: WO 2009/140549
Referencia 8 de la bibliografía de patentes: Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2004-259834
Referencia 9 de la bibliografía de patentes: Patente de EE. UU. N.º 6217866

Bibliografía no relacionada con patentes

Referencia 1 de la bibliografía no relacionada con patentes: *Oncology Reports*, 5, 1013-1024, 1998.
Referencia 2 de la bibliografía no relacionada con patentes: *Advances in Cancer Research*, 67, 257-279, 1995.
Referencia 3 de la bibliografía no relacionada con patentes: *Current Cancer Drug Targets*, 6, 65-75, 2006.
Referencia 4 de la bibliografía no relacionada con patentes: *Nature Reviews, Cancer*, 10, 116-129, 2010.
Referencia 5 de la bibliografía no relacionada con patentes: *Clinical Cancer Research*, 15, 7119-7123, 2009.

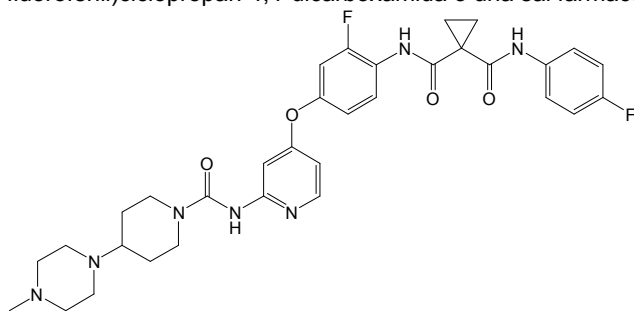
Resumen de la invención**Problema técnico**

5 Sin embargo, los efectos terapéuticos, de los que se tiene constancia hasta la fecha, obtenidos por combinación de una pluralidad de agentes antitumorales fueron insuficientes y, por lo tanto, se espera que se desarrolle una nueva terapia combinada utilizando agentes antitumorales.

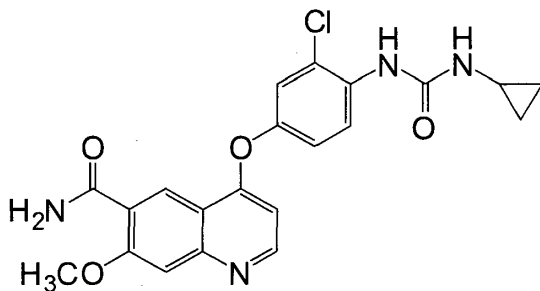
Solución al problema

10 En vista de tales circunstancias, los presentes inventores han realizado estudios intensivos para descubrir que la administración de una combinación de los compuestos

N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



15 y 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonilo)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



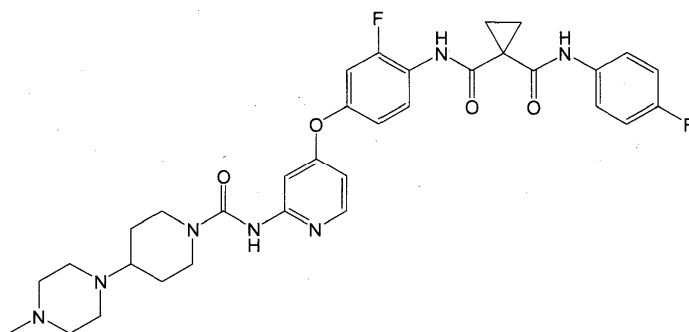
20 a un paciente que padece un tumor logra un efecto antitumoral inesperado excelente, y de esta manera completa la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona los siguientes compuestos [1] a [8].

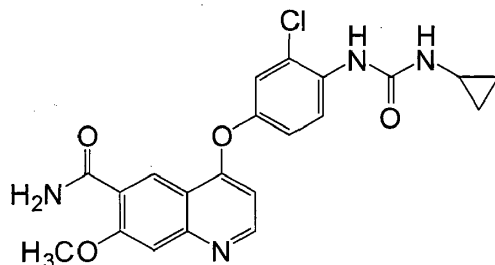
[1] Un agente tumoral para el uso combinado de:

N-(2-fluoro-4-{[2-({[4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil}amino)piridin-4-il]oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta

25



y 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



5 [2] Un agente antitumoral para la administración simultánea o por separado de *N*-(2-fluoro-4-([2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino)piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta y 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

10 [3] Una composición farmacéutica que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de *N*-(2-fluoro-4-([2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino)piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta y un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida.

15 [4] Una composición farmacéutica que comprende *N*-(2-fluoro-4-([2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino)piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta y 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta y un vehículo.

[5] Un kit que comprende:

20 una composición farmacéutica que comprende *N*-(2-fluoro-4-([2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino)piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta y un vehículo; y

una composición farmacéutica que comprende 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta y un vehículo.

Efectos beneficiosos de la invención

25 La presente invención proporciona un agente antitumoral para el uso combinado de un compuesto con un efecto inhibitorio de HGFR y un compuesto con un efecto inhibitorio de múltiples tirosina-cinasas. Este tipo de agente antitumoral exhibe un efecto antitumoral excelente en comparación con los casos en los que estos se utilizan de forma individual y exhibe efectos antitumorales contra varios tipos de cánceres.

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 es una gráfica que muestra el efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de melanoma maligno humano (SEK1).

La Figura 2 es una gráfica que muestra el efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de cáncer pancreático humano (KP-4).

35 La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de cáncer gástrico humano (IM95m).

40 La Figura 4 es una gráfica que muestra el efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de cáncer de ovario humano (A2780).

La Figura 5 es una gráfica que muestra el efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de glioblastoma humano (U87MG).

Descripción de realizaciones

El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante el método que se describe en la referencia 1 de la bibliografía de patentes. Además, el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante el método que se describe en la referencia 2 de la bibliografía de patentes.

Los ejemplos de sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos, sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas y sales con aminoácidos ácidos o básicos.

Los ejemplos preferidos de las sales con ácidos inorgánicos incluyen sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico. Los ejemplos preferidos de las sales con ácidos orgánicos incluyen sales con ácido acético, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido esteárico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico.

Los ejemplos preferidos de las sales con bases inorgánicas incluyen sales de metales alcalinos tales como una sal de sodio y una sal de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como una sal de calcio y una sal de magnesio; una sal de aluminio; y una sal de amonio. Los ejemplos preferidos de las sales con bases orgánicas incluyen sales con dietilamina, dietanolamina, meglumina, *N,N*-dibenciletilenodiamina.

Los ejemplos preferidos de las sales con aminoácidos ácidos incluyen sales con ácido aspártico, ácido glutámico. Los ejemplos preferidos de las sales con aminoácidos básicos incluyen sales con arginina, lisina, ornitina.

Las sales farmacéuticamente aceptables especialmente preferidas son sales con ácidos orgánicos.

El agente antitumoral de la presente invención se puede administrar por vía oral en forma de una formulación sólida tal como un comprimido, gránulo, gránulo fino, polvo o cápsula, o en forma de un líquido, jalea, jarabe.

Además, el agente antitumoral de la presente invención se puede administrar por vía parenteral en forma de una inyección, supositorio, pomada, cataplasma.

La dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este representados por la Fórmula (I) se puede seleccionar de forma adecuada dependiendo del grado de los síntomas, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente, la diferencia en la sensibilidad, la vía, el tiempo y el intervalo de administración, el tipo de formulación farmacéutica. Normalmente, en los casos en los que se lleva a cabo una administración oral para un adulto (60 kg de peso corporal), la dosis está comprendida entre 10 y 6000 mg, preferentemente entre 50 y 4000 mg al día. Esta dosis se puede administrar en una única toma o se puede dividir en 2 o 3 tomas al día.

La dosis del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este representados por la Fórmula (II) se puede seleccionar de forma adecuada como en el caso que se describió anteriormente. Normalmente, en los casos en los que se lleva a cabo una administración oral para un adulto (60 kg de peso corporal), la dosis está comprendida entre 1 y 600 mg, preferentemente entre 4 y 400 mg, más preferentemente entre 4 y 200 mg al día. Esta dosis se puede administrar en una única toma o se puede dividir en 2 o 3 tomas al día.

En los casos en los que se prepare una formulación oral sólida, se puede añadir un vehículo y, si procede, un aglutinante, desintegrante, lubricante, agente colorante, agente saborizante al componente principal, es decir, un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este representados por la Fórmula (I) y un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de este representados por la Fórmula (II), para preparar posteriormente un comprimido, gránulo, gránulo fino, polvo, cápsula de acuerdo con un método convencional.

Los ejemplos de vehículo incluyen lactosa, almidón de maíz, azúcar blanco blando, glucosa, sorbitol, celulosa cristalina y dióxido de silicio. Los ejemplos de aglutinante incluyen alcohol polivinílico, etilcelulosa, metilcelulosa, goma arábiga, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Los ejemplos de lubricante incluyen estearato de magnesio, talco y sílice. Los ejemplos de agente colorante incluyen óxido de titanio, sesquióxido de hierro, sesquióxido de hierro amarillo, cochinilla, carmín y riboflavina. Los ejemplos de agente saborizante incluyen cacao en polvo, ácido ascórbico, ácido tartárico, aceite de menta, borneol y canela en polvo. Estos comprimidos y gránulos se pueden recubrir según se requiera.

En los casos en los que se prepare una inyección, se puede añadir un regulador del pH, agente tamponante, agente de suspensión, solubilizante, estabilizante, agente isotónico, conservante al componente principal, según se requiera, para preparar una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, o una infusión por goteo intravenoso. Según se requiera, estas inyecciones se pueden preparar en forma de productos liofilizados mediante métodos convencionales.

Los ejemplos de agente de suspensión incluyen metilcelulosa, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa, goma arábiga,

tragacanto en polvo, carboximetilcelulosa sódica y monolaurato de sorbitán polioxietileno.

Los ejemplos de solubilizante incluyen aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato de sorbitán polioxietileno, macrogol, y éster de ácido graso y glicerina.

Los ejemplos de estabilizante incluyen sulfito de sodio y metabisulfito de sodio. Los ejemplos de conservante incluyen *para*-hidroxibenzoato de metilo, *para*-hidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol.

El agente antitumoral de la presente invención se puede preparar formulando *N*-(2-fluoro-4-([2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi)fenil)-*N*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida y o una sal farmacéuticamente aceptable de esta por separado, y ambas se pueden administrar a la vez o por separado. Además, las dos formulaciones se pueden introducir en un único envase para proporcionar la denominada formulación en kit. Además, ambos compuestos pueden estar contenidos en una única formulación.

El tipo de tumor que se vaya a tratar con el agente antitumoral de la presente invención no está limitado, y los ejemplos del tipo de tumor incluyen fibroma, adipoma, mixoma, condroma, osteoma, angioma, linfoma, mieloma, melanoma, mioma, neuroma, glioma, osteosarcoma, miosarcoma, fibrosarcoma, papiloma, adenoma, tumor cerebral y cánceres tales como el cáncer del cuello uterino, cáncer de esófago, cáncer de lengua, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado en el duodeno, yeyuno, íleon, cáncer del intestino grueso en el colon, ciego, recto, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de la tiroides y cáncer faríngeo; y tumores mixtos de estos tipos.

Ejemplos

La presente invención se describe más detalladamente mediante los siguientes ejemplos.

[Lista de abreviaturas]

FBS: suero fetal bovino

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

VT: volumen tumoral

VTR: volumen tumoral relativo

Compuesto A: mesilato de 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida

Compuesto B: tartrato de *N*-(2-fluoro-4-([2-([4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il]carbonil)amino]piridin-4-il]oxi)fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida

Ejemplo 1: Efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de melanoma maligno humano (SEKI)

La línea celular de melanoma maligno humano SEKI (banco de células JCRB) se cultivó con un medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS (SIGMA) en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente un 80%, las células se recogieron utilizando tripsina-EDTA. A estas células se añadió solución salina equilibrada de Hank que contenía un 50% de Matrigel para preparar una suspensión con una densidad de 5.0×10^7 células/mL. La suspensión celular obtenida de este modo se trasplantó por vía subcutánea al costado del cuerpo de un ratón atómico (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrIcrJ, Laboratorios Charles River Inc., Japón) en una cantidad de 0.1 mL, conteniendo cada grupo seis ratones. 11 días después del trasplante, se administraron por vía oral el Compuesto A (10 mg/kg, una vez al día, durante 17 días) y el Compuesto B (100 mg/kg, una vez al día, durante 17 días) de forma individual o ambos de forma consecutiva.

Fijando el primer día de la administración como Día 0, se midieron posteriormente el eje mayor y el eje menor de un tumor desarrollado en cada ratón utilizando un calibrador Digimatic (Corporación Mitsutoyo) los Días 3, 7, 10, 14 y 17.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$VT = \text{eje mayor (mm)} \times \text{eje menor}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

$$VTR = VT \text{ el día de la medición} / VT \text{ el primer día de la administración}$$

Los resultados de VTR se resumen en la Tabla 1 y la Figura 1. Los números de la Tabla indican un valor medio $\pm$ desviación estándar (lo mismo se aplicará para las siguientes Tablas). En comparación con los casos en los que el Compuesto A y el Compuesto B se administraron cada uno de forma individual, el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B exhibió un efecto antitumoral extraordinariamente excelente. Además, como resultado de un análisis bilateral ANOVA con respecto al VTR transformado logarítmicamente en el que se fijaron el Compuesto A y el Compuesto B como factores, se observó que el VTR el Día 17 era significativo desde un punto de vista estadístico ($p < 0.05$), lo cual confirmó el efecto sinérgico del Compuesto A y el Compuesto B.

[Tabla 1]

	Día 3	Día 7	Día 10
Grupo de control	1.63±0.10	3.35±0.56	4.95±1.00
Grupo del Compuesto A	1.71±0.19	2.88±0.35	3.74±0.53
Grupo del Compuesto B	1.76±0.22	2.93±0.57	4.06±0.85
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	1.43±0.06	2.10±0.38	2.66±0.19
	Día 14	Día 17	
Grupo de control	7.18±1.66	8.65±1.89	
Grupo del Compuesto A	5.06±0.49	5.92±0.50	
Grupo del Compuesto B	5.23±0.20	5.80±1.35	
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	2.80±0.27	2.77±0.38	

- 5 Ejemplo 2: Efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en que se trasplantó una línea celular de cáncer pancreático humano (KP-4)

La línea celular de cáncer pancreático humano KP-4 (adquirida del Hospital Nacional de Organización del Centro del
 10 Cáncer de Kyushu) se cultivó con un medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS (SIGMA) en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente un 80%, las células se recogieron utilizando tripsina-EDTA. A estas células se añadió solución salina equilibrada de Hank que contenía un 50% de Matrigel para preparar una suspensión con una densidad de 5.0×10^7 células/mL. La suspensión celular obtenida de este modo se trasplantó por vía subcutánea al costado del cuerpo de un ratón atímico (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrj, Laboratorios Charles River Inc., Japón) en una cantidad de 0.1 mL, conteniendo
 15 cada grupo seis ratones. 11 días después del trasplante, se administraron por vía oral el Compuesto A (10 mg/kg, una vez al día, durante 17 días) y el Compuesto B (100 mg/kg, una vez al día, durante 17 días) de forma individual o ambos de forma consecutiva.

20 Fijando el primer día de la administración como Día 0, se midieron posteriormente el eje mayor y el eje menor de un tumor desarrollado en cada ratón utilizando un calibrador Digimatic (Corporación Mitsutoyo) los Días 3, 7, 10, 14 y 17.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$VT = \text{eje mayor (mm)} \times \text{eje menor}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

$$VTR = VT \text{ el día de la medición} / VT \text{ el primer día de la administración}$$

25 Los resultados de VTR se resumen en la Tabla 2 y la Figura 2. En comparación con los casos en los que el Compuesto A y el Compuesto B se administraron cada uno de forma individual, el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B exhibió un efecto antitumoral extraordinariamente excelente. Además, como resultado de un análisis bilateral ANOVA con respecto al VTR transformado logarítmicamente en el que se fijaron el Compuesto A y el
 30 Compuesto B como factores, se observó que el VTR el Día 17 era significativo desde un punto de vista estadístico ($p < 0.05$), lo cual confirmó el efecto sinérgico del Compuesto A y el Compuesto B.

[Tabla 2]

	Día 3	Día 7	Día 10
Grupo de control	2.27±0.25	4.68±0.70	7.12±1.35
Grupo del Compuesto A	1.67±0.16	2.89±0.74	3.77±1.26
Grupo del Compuesto B	1.71±0.26	3.33±1.06	4.72±1.55
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	1.40±0.14	1.54±0.24	1.64±0.23
	Día 14	D 17	
Grupo de control	9.65±2.61	9.92±3.07	
Grupo del Compuesto A	4.83±1.75	5.81±2.17	
Grupo del Compuesto B	6.53±2.19	9.05±3.71	
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	1.79±0.32	2.13±0.52	

- 35 Ejemplo 3: Efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de cáncer gástrico humano (IM95m)

La línea celular de cáncer gástrico humano IM95m (Banco de Recursos de Investigación de Ciencias de la Salud) se cultivó con un medio DMEM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) que contenía 4500 mg/mL de glucosa, un 10% de FBS y 10 µg/mL de insulina en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente un 80%, las células se recogieron utilizando tripsina-EDTA. A estas células se añadió solución salina equilibrada de Hank que contenía un 50% de Matrigel para preparar una suspensión con una densidad de 1.0×10^8 células/mL. La suspensión celular obtenida de este modo se trasplantó por vía subcutánea al costado del cuerpo de un ratón atímico (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, Laboratorios Charles River Inc., Japón) en una cantidad de 0.1 mL, conteniendo cada grupo seis ratones. 13 días después del trasplante, se administraron de forma continua por vía oral el Compuesto A (10 mg/kg, una vez al día, durante 21 días) y el Compuesto B (100 mg/kg, una vez al día, durante 21 días) de forma individual o ambos de forma consecutiva.

Fijando el primer día de la administración como Día 0, se midieron posteriormente el eje mayor y el eje menor de un tumor desarrollado en cada ratón utilizando un calibrador Digimatic (Corporación Mitsutoyo) los Días 4, 7, 11, 14, 18 y 21.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$VT = \text{eje mayor (mm)} \times \text{eje menor}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

$$VTR = VT \text{ el día de la medición} / VT \text{ el primer día de la administración}$$

Los resultados de VTR se resumen en la Tabla 3 y la Figura 3. En comparación con los casos en los que el Compuesto A y el Compuesto B se administraron cada uno de forma individual, el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B exhibió un efecto antitumoral extraordinariamente excelente. Aunque no se observó ningún resultado significativo desde un punto de vista estadístico mediante un análisis bilateral ANOVA, se confirmó que existía un efecto de inhibición total de la proliferación tumoral mediante el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B.

[Tabla 3]

	Día 4	Día 7	Día 11
Grupo de control	1.97±0.16	2.87±0.20	4.91±0.64
Grupo del Compuesto A	1.53±0.12	2.10±0.18	2.65±0.37
Grupo del Compuesto B	1.12±0.08	1.24±0.15	1.75±0.17
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	0.92±0.12	0.89±0.22	0.76±0.09
	Día 14	Día 18	Día 21
Grupo de control	6.27±0.83	8.38±1.41	10.36±1.74
Grupo del Compuesto A	2.65±0.49	2.80±0.47	3.18±0.57
Grupo del Compuesto B	1.85±0.16	3.09±0.48	4.02±1.05
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	0.73±0.15	0.91±0.14	1.00±0.25

Ejemplo 4: Efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de cáncer de ovario humano (A2780)

La línea celular de cáncer de ovario humano A2780 (ATCC) se cultivó con un medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS (SIGMA) en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente un 80%, las células se recogieron utilizando tripsina-EDTA. A estas células se añadió solución salina equilibrada de Hank que contenía un 50% de Matrigel para preparar una suspensión con una densidad de 5.0×10^7 células/mL. La suspensión celular obtenida de este modo se trasplantó por vía subcutánea al costado del cuerpo de un ratón atímico (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrlj, Laboratorios Charles River Inc., Japón) en una cantidad de 0.1 mL, conteniendo cada grupo seis ratones. El Compuesto A (10 mg/kg, una vez al día, durante 10 días) y el Compuesto B (100 mg/kg, una vez al día, durante 10 días) se administraron por vía oral de forma individual o ambos de forma consecutiva.

Fijando el primer día de la administración como Día 0, se midieron posteriormente el eje mayor y el eje menor de un tumor desarrollado en cada ratón utilizando un calibrador Digimatic (Corporación Mitsutoyo) los Días 3, 5, 8 y 10.

El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$VT = \text{eje mayor (mm)} \times \text{eje menor}^2 (\text{mm}^2) / 2$$

$$VTR = VT \text{ el día de la medición} / VT \text{ el primer día de la administración}$$

Los resultados de VTR se resumen en la Tabla 4 y la Figura 4. En comparación con los casos en los que el Compuesto A y el Compuesto B se administraron cada uno de forma individual, el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B exhibió un efecto antitumoral extraordinariamente excelente. Además, como resultado de un análisis bilateral ANOVA con respecto al VTR transformado logarítmicamente en el que se fijaron el Compuesto A y el

Compuesto B como factores, se observó que el VTR el Día 10 era significativo desde un punto de vista estadístico ($p < 0.05$), lo cual confirmó el efecto sinérgico del Compuesto A y el Compuesto B.

[Tabla 4]

5

	Día 3	Día 5
Grupo de control	2.37±0.60	7.52±1.45
Grupo del Compuesto A	1.92±0.17	4.77±0.85
Grupo del Compuesto B	2.23±0.42	7.01±1.54
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	1.38±0.12	1.95±0.27
	Día 8	Día 10
Grupo de control	17.47±3.75	20.41±6.02
Grupo del Compuesto A	9.51±2.44	12.37±3.53
Grupo del Compuesto B	15.70±2.27	21.29±2.76
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	2.50±0.76	3.34±1.30

Ejemplo 5: Efecto combinado del Compuesto A y el Compuesto B en un modelo animal en el que se trasplantó una línea celular de glioblastoma humano (U87MG)

- 10 La línea celular de glioblastoma humano (U87MG) (ATCC) se cultivó con un medio E-MEM que contenía un 10% de FBS (SIGMA) en una incubadora con un 5% de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron un estado de confluencia de aproximadamente un 80%, las células se recogieron utilizando tripsina-EDTA. A estas células se añadió solución salina equilibrada de Hank que contenía un 50% de Matrigel para preparar una suspensión con una densidad de 5.0×10^7 células/mL. La suspensión celular obtenida de este modo se trasplantó por vía subcutánea al
- 15 costado del cuerpo de un ratón atímico (CAnN.Cg-FOXn1nu/CrlCrJ, Laboratorios Charles River Inc., Japón) en una cantidad de 0.1 mL, conteniendo cada grupo seis ratones. El Compuesto A (10 mg/kg, una vez al día, durante 21 días) y el Compuesto B (100 mg/kg, una vez al día, durante 21 días) se administraron por vía oral de forma individual o ambos de forma consecutiva.
- 20 Fijando el primer día de la administración como Día 0, se midieron posteriormente el eje mayor y el eje menor de un tumor desarrollado en cada ratón utilizando un calibrador Digimatic (Corporación Mitsutoyo) los Días 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 y 21.
- El volumen tumoral y el volumen tumoral relativo se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación.
- VT = eje mayor (mm) $\times$ eje menor² (mm²) / 2
- 25 VTR = VT el día de la medición / VT el primer día de la administración

Los resultados de VTR se resumen en la Tabla 5 y la Figura 5. En comparación con los casos en los que el Compuesto A y el Compuesto B se administraron cada uno de forma individual, el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B exhibió un efecto antitumoral extraordinariamente excelente. Además, aunque no se observó ningún

30 resultado significativo desde un punto de vista estadístico mediante un análisis bilateral ANOVA realizado con respecto al VTR transformado logarítmicamente en el que se fijaron el Compuesto A y el Compuesto B como factores, se confirmó que existía un efecto de inhibición total de la proliferación tumoral mediante el uso combinado del Compuesto A y el Compuesto B.

35 [Tabla 5]

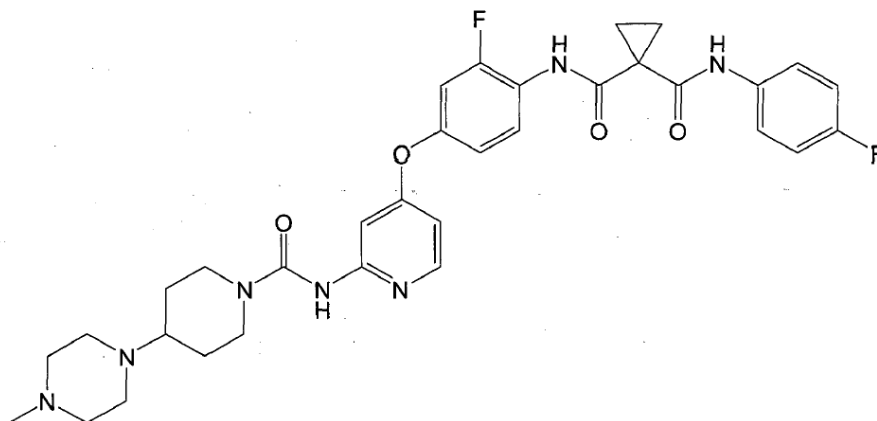
	Día 2	Día 5	Día 7
Grupo de control	1.30±0.19	1.86±0.45	2.45±0.71
Grupo del Compuesto A	0.95±0.08	1.27±0.07	1.59±0.16
Grupo del Compuesto B	0.69±0.05	0.61±0.05	0.56±0.10
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	0.59±0.05	0.49±0.10	0.44±0.09
	Día 9	Día 12	Día 14
Grupo de control	3.19±0.89	5.71±1.58	8.88±2.26
Grupo del Compuesto A	1.85±0.13	3.29±0.32	4.76±0.49
Grupo del Compuesto B	0.57±0.07	0.65±0.08	0.73±0.12
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	0.36±0.11	0.48±0.16	0.46±0.17
	Día 16	Día 19	Día 21
Grupo de control	12.13±3.46	18.47±6.88	23.08±8.72

ES 2 573 515 T3

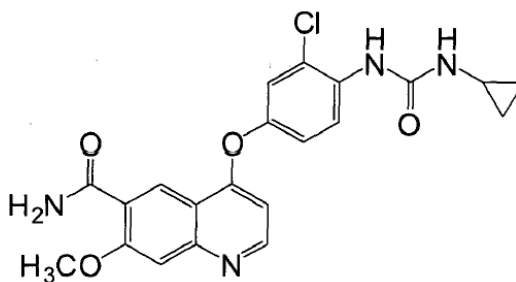
Grupo del Compuesto A	6.19±0.95	9.60±1.99	11.53±2.57
Grupo del Compuesto B	0.93±0.13	1.65±0.37	2.23±0.51
Grupo de combinación del Compuesto A y el Compuesto B	0.59±0.20	0.78±0.26	0.95±0.38

REIVINDICACIONES

1. *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



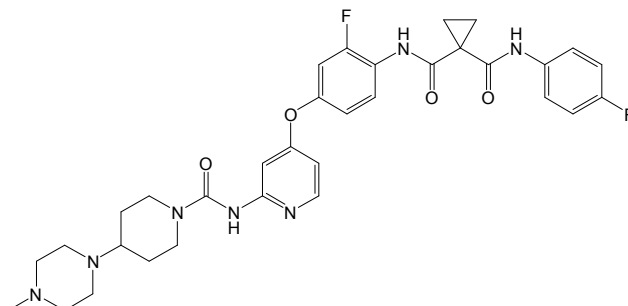
y 4-(3-cloro-4-{{(ciclopropilamino)carbonil}amino}fenoxi)-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



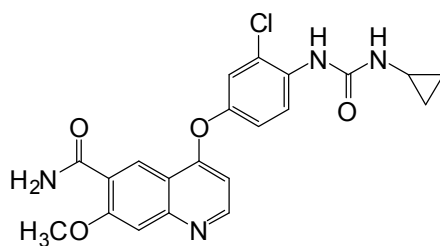
para el uso combinado en el tratamiento de tumores.

2. Los compuestos para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde los compuestos son para la administración simultánea o por separado.

3. Una composición farmacéutica que comprende *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



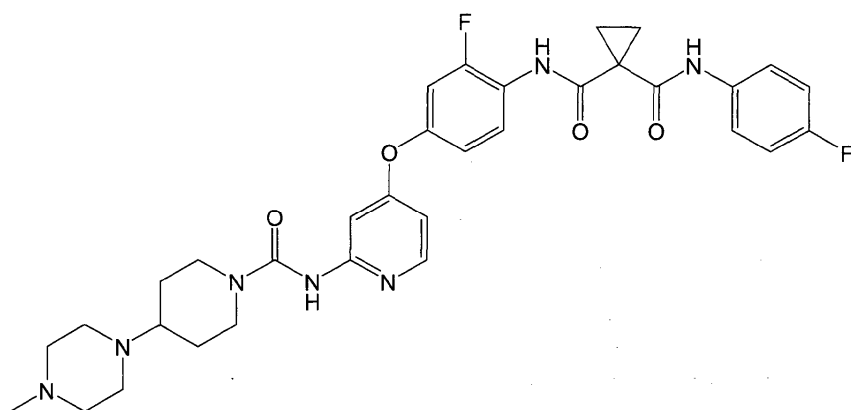
y 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta



4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 que además comprende un vehículo.

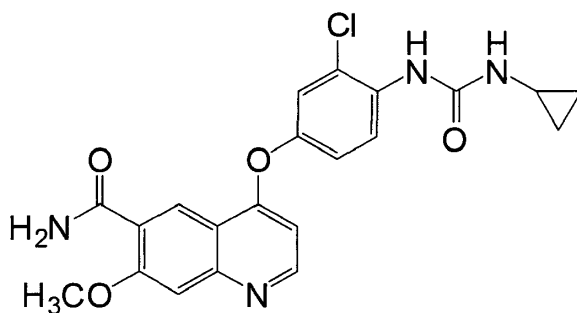
5. Un kit que comprende:

una composición farmacéutica que comprende *N*-(2-fluoro-4-{{2-({4-(4-metilpiperazin-1-il)piperidin-1-il}carbonil)amino}piridin-4-il}oxi}fenil)-*N'*-(4-fluorofenil)ciclopropano-1,1-dicarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:



10 y un vehículo; y

una composición farmacéutica que comprende 4-[3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi]-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de esta:



y un vehículo.

15

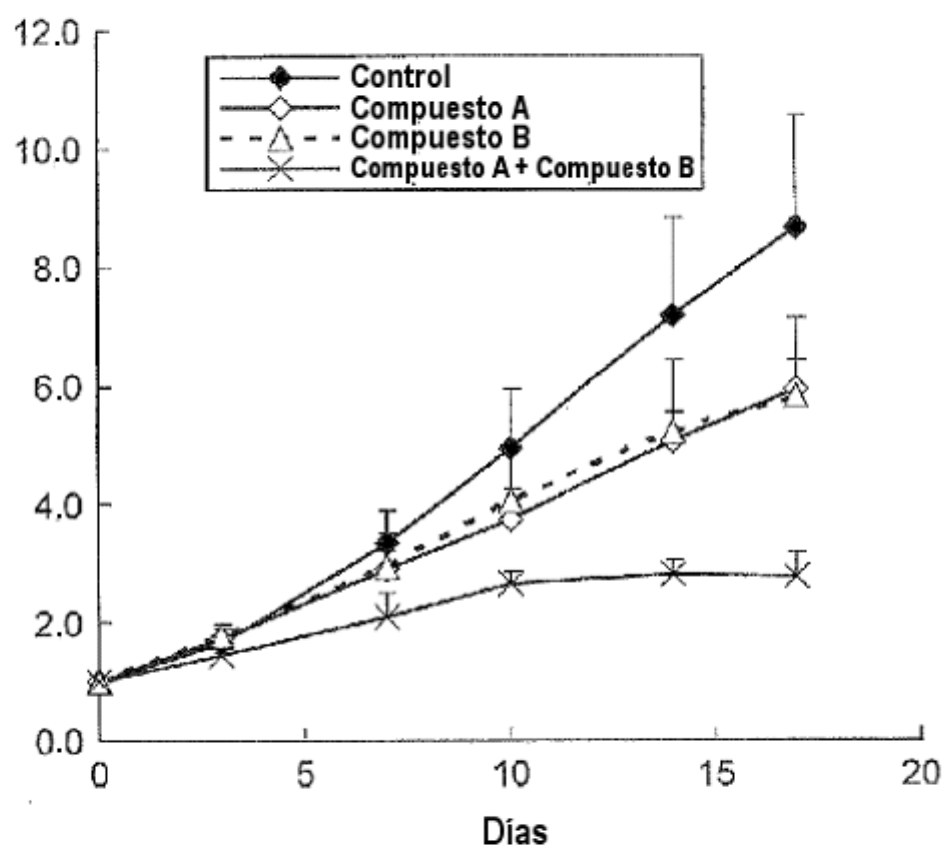
Fig.1

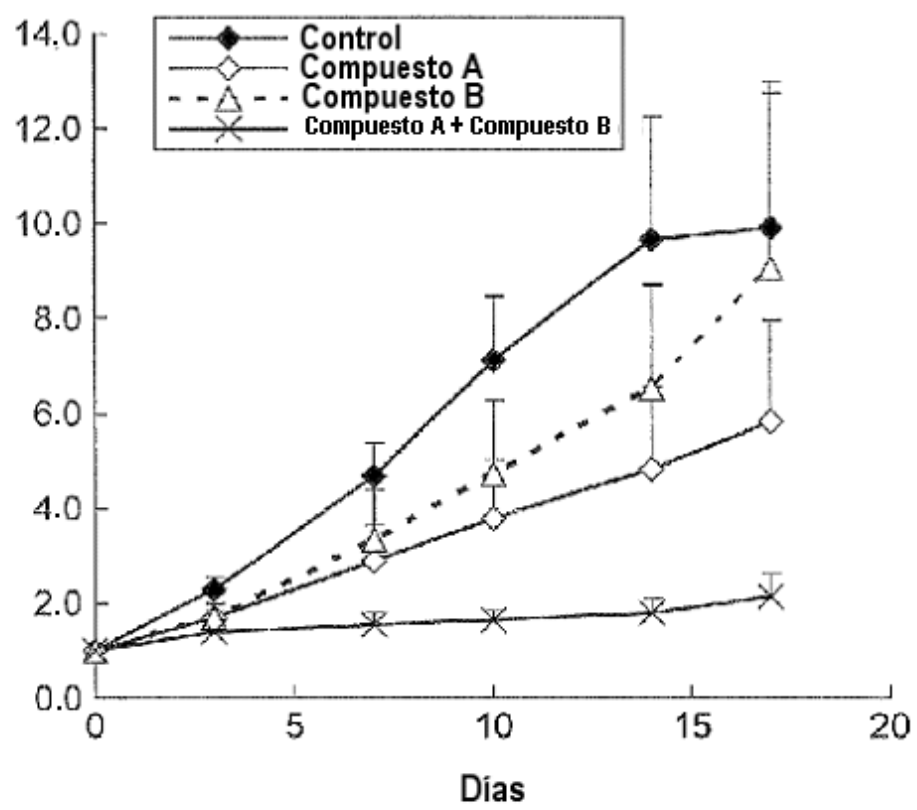
Fig.2

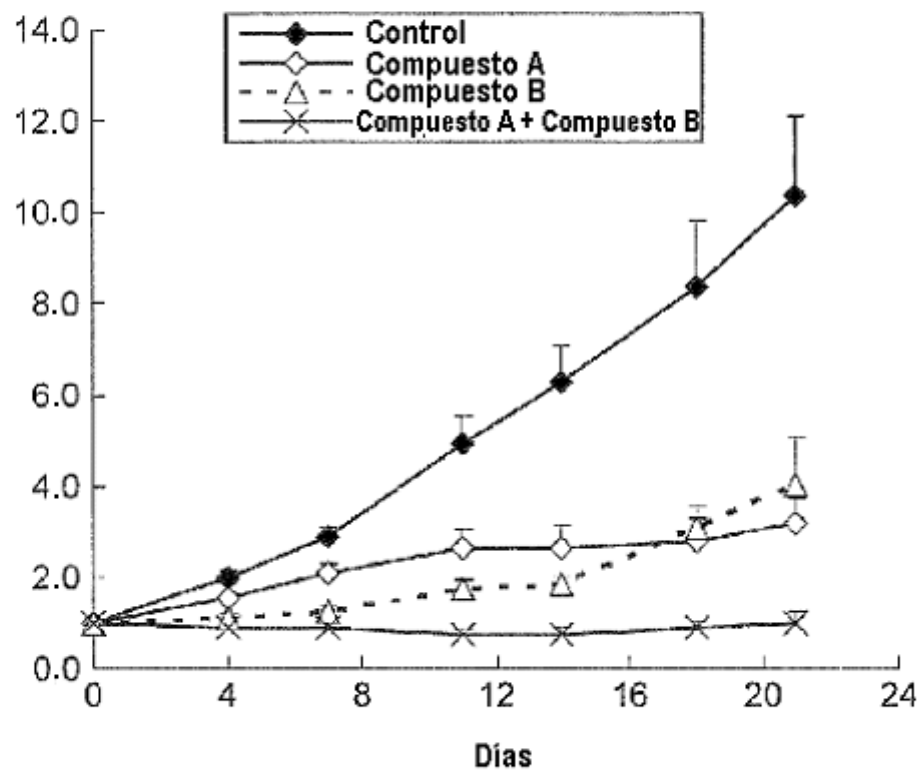
Fig.3

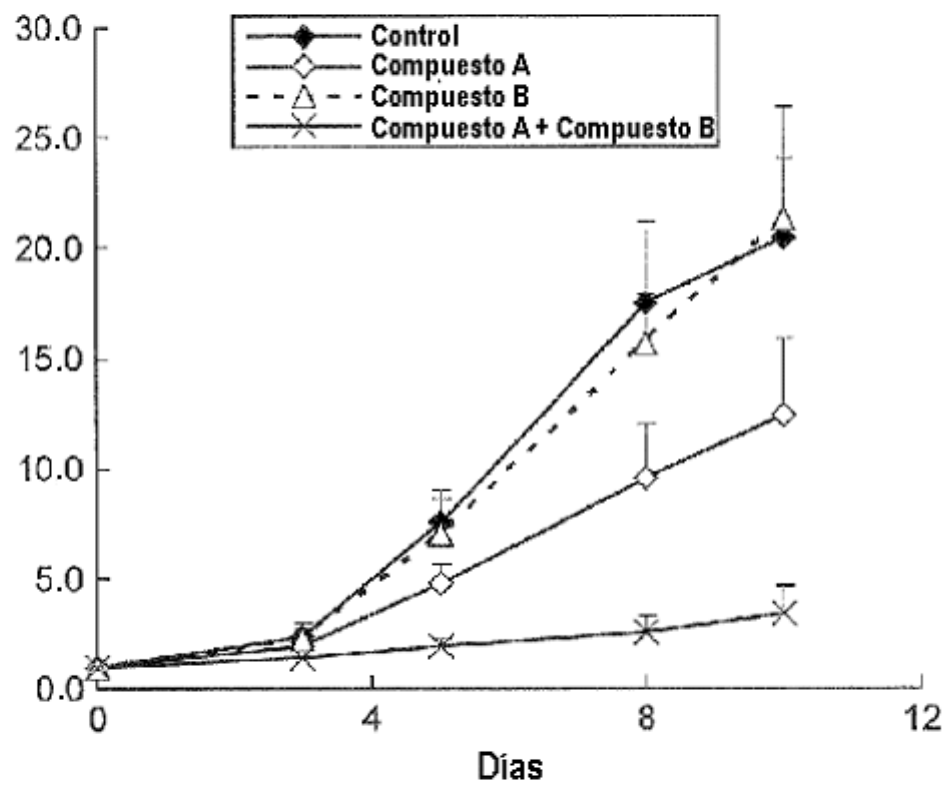
Fig.4

Fig.5