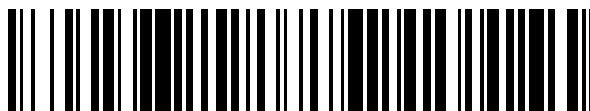


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 073**

51 Int. Cl.:

C07D 515/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4995 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2018 E 18382287 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3395820**

54 Título: **Compuestos antitumorales**

30 Prioridad:

27.04.2017 EP 17382228

26.07.2017 EP 17382497

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

05.02.2020

73 Titular/es:

PHARMA MAR, S.A. (100.0%)

Avenida de los Reyes, 1, Polígono Industrial La Mina

28770 Colmenar Viejo, Madrid, ES

72 Inventor/es:

CUEVAS MARCHANTE, MARÍA DEL CARMEN;

FRANCESCH SOLLOSO, ANDRÉS y

MARTÍNEZ BARRASA, VALENTÍN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 740 073 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

Compuestos antitumorales

5 **Campo de la invención**

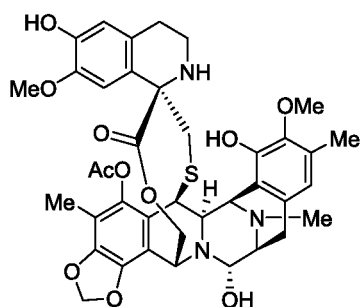
La presente invención se refiere a análogos sintéticos de las ecteinascidinas, particularmente de ecteinascidina 736 (ET-736), composiciones farmacéuticas que los contienen, métodos para su fabricación y su uso como agentes antitumorales.

10

Antecedentes de la invención

Las ecteinascidinas son agentes antitumorales extremadamente potentes aislados del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata*. Uno de estos compuestos, ET-743 de fórmula:

15

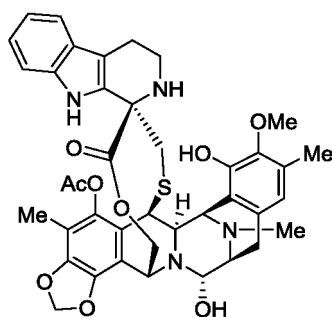


está siendo empleado como un medicamento contra el cáncer, bajo la denominación internacional no patentada (INN) trabectedina, para el tratamiento de pacientes con sarcoma de tejidos blandos (STS) avanzado y metastásico después del fracaso de las antraciclinas y la ifosfamida, o que no son adecuados para recibir dichos agentes, y para el tratamiento del cáncer de ovario sensible al platino recidivante en combinación con doxorubicina liposomal pegilada.

20

La ecteinascidina 736 (ET-736) fue descubierta por primera vez por Rinehart y presenta una unidad de tetrahydro- β -carbolina en lugar de la unidad de tetrahydroisoquinolina más comúnmente encontrada en los compuestos de ecteinascidina aislados de fuentes naturales; véase, por ejemplo, Sakai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, vol. 89, 11456-11460.

25



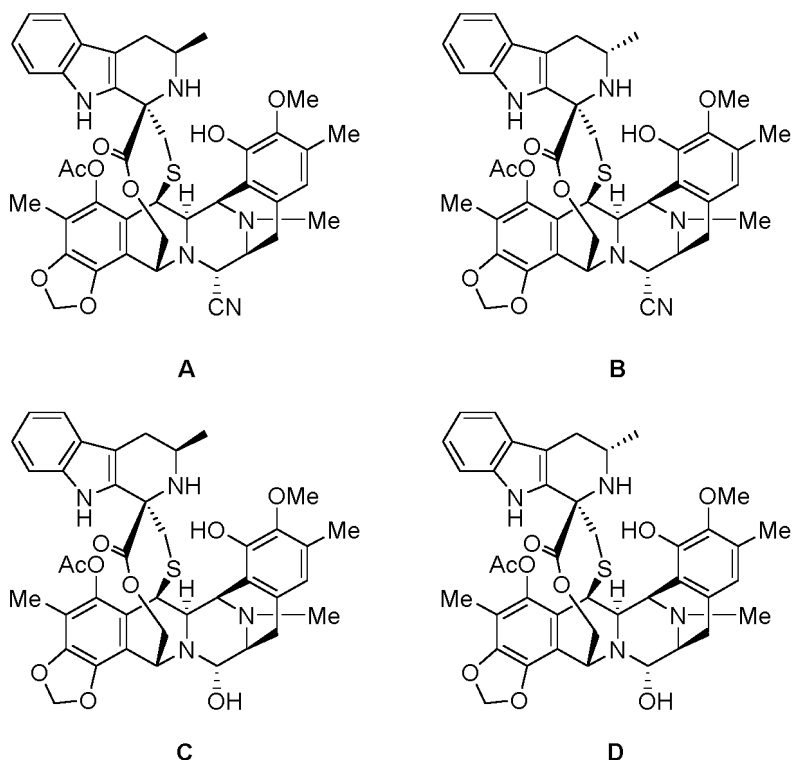
ET-736

La Patente de Estados Unidos N.º 5.149.804 describe Ecteinascidina 736 (ET-736), aislada del tunicado caribeño *Ecteinascidia turbinata*, y su estructura. ET-736 protege a los ratones *in vivo* a concentraciones muy bajas contra el linfoma P388, el melanoma B16 y el carcinoma de pulmón de Lewis.

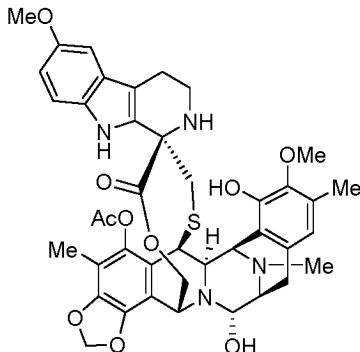
30

El documento WO03014127 describe varios análogos sintéticos de ET-736 y su actividad citotóxica contra células tumorales. En particular, el documento WO03014127 describe los compuestos **A** a **D** junto con su actividad citotóxica contra un panel de líneas celulares de cáncer.

35



- 5 Otro compuesto descrito en esta solicitud de patente, **PM01183**, se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. **PM01183** tiene la siguiente estructura química:



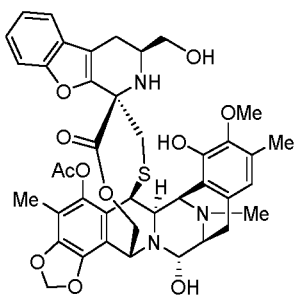
- 10 **PM01183** ha demostrado una actividad *in vitro* altamente potente contra líneas de células tumorales sólidas y no sólidas, así como una actividad *in vitro* significativa en varias líneas de células de tumor humano en xenoinjerto en ratones, tales como las de cáncer de mama, riñón y ovario. **PM01183** ejerce sus efectos anticancerosos a través de la modificación covalente de las guaninas en el surco menor del ADN que eventualmente da lugar a la rotura bicatenaria del ADN, la detención de la fase S y la apoptosis en las células cancerosas.

- 15 El documento WO2011147828 describe procedimientos de preparación de análogos de ecteinascidina que actúan como agentes anticancerosos.

- 20 A pesar de los resultados positivos obtenidos en aplicaciones clínicas en quimioterapia, la búsqueda en el campo de los compuestos de ecteinascidina todavía está abierta a la identificación de nuevos compuestos con características óptimas de actividad, selectividad hacia el tumor, con una toxicidad sistémica reducida y/o mejorada de las propiedades farmacocinéticas.

Sumario de la invención

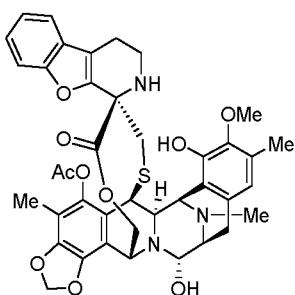
- 25 En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de Fórmula **V** o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo:



V.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un compuesto de Fórmula VI o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo:

5



VI.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma de dosificación que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto, una composición farmacéutica o una forma de dosificación de acuerdo con la presente invención para su uso como un medicamento.

15

En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto, una composición farmacéutica o una forma de dosificación de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de cáncer.

En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto, una composición farmacéutica o una forma de dosificación de acuerdo con la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Se divulga adicionalmente un método para la prevención o el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la presente invención, o administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, o administrar una cantidad eficaz de una forma de dosificación de acuerdo con la presente invención a un paciente que lo necesita, particularmente un ser humano.

20

25

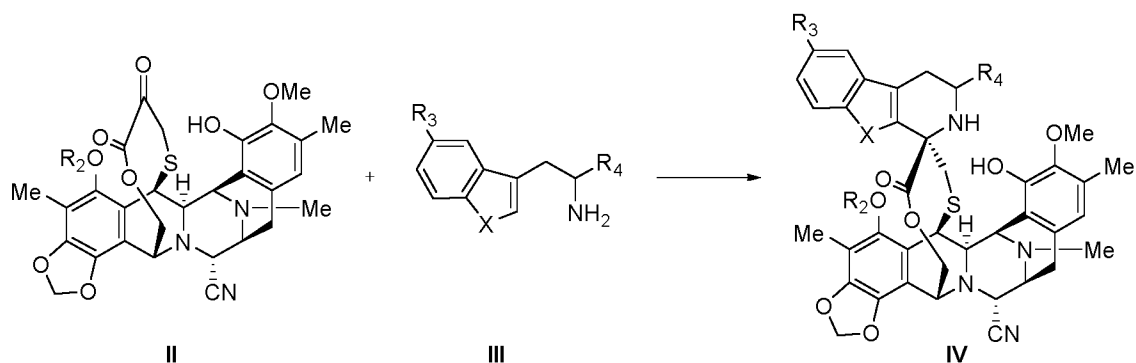
En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento, preferiblemente para el tratamiento del cáncer.

30

En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit es para su uso en el tratamiento del cáncer.

En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para obtener el compuesto de Fórmula V o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto de Fórmula VI o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo; que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III para dar un compuesto de fórmula IV:

35



en la que:

- 5 X es -O-;
 R₂ es acetilo;
 R₃ es hidrógeno;
 R₄ se selecciona de hidrógeno o -CH₂OH.

- 10 El proceso puede incluir la etapa adicional de reemplazar el grupo ciano en el compuesto de fórmula IV con un grupo hidroxilo para dar un compuesto de fórmula V o VI.

Breve descripción de las figuras

- 15 **Figura 1.** Evaluación del diámetro tumoral total de tumores HT1080 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
Figura 2. Evaluación del volumen tumoral de tumores MDA-MB-231 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
 20 **Figura 3.** Evaluación del volumen tumoral de tumores H460 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
Figura 4. Evaluación del volumen tumoral de tumores H526 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
Figura 5. Evaluación del volumen tumoral de tumores H82 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
 25 **Figura 6.** Evaluación del volumen tumoral de tumores A2780 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
Figura 7. Evaluación del volumen tumoral de tumores HGC27 en ratones tratados con placebo, compuesto C y 39-S.
Figura 8. Evaluación del diámetro tumoral total de tumores HT1080 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
 30 **Figura 9.** Evaluación del volumen tumoral de tumores MDA-MB-231 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
Figura 10. Evaluación del volumen tumoral de tumores H460 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
Figura 11. Evaluación del volumen tumoral de tumores H526 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
Figura 12. Evaluación del volumen tumoral de tumores H82 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
Figura 13. Evaluación del volumen tumoral de tumores A2780 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
 35 **Figura 14.** Evaluación del volumen tumoral de tumores HGC27 en ratones tratados con placebo, ET-736 y 32.
Figura 15. Evaluación del volumen tumoral de tumores PC-3 en ratones tratados con placebo y 39-S.
Figura 16. Evaluación del volumen tumoral de tumores DU-145 en ratones tratados con placebo y 39-S.
Figura 17. Evaluación del volumen tumoral de tumores 22Rv1 en ratones tratados con placebo y 39-S.

40 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Lo siguiente se aplica a todos los aspectos de la presente invención:

- Los términos "sal farmacéuticamente aceptable" y "éster" se refieren a cualquier sal o éster farmacéuticamente aceptable que, tras la administración al paciente, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto como se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que las sales no farmacéuticamente aceptables también están dentro del alcance de la invención, ya que pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de las sales puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

- 50 Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento se sintetizan a partir de los compuestos precursores, que contienen un resto básico o ácido, por métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar el ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos. Generalmente, se prefieren los medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, 2-

propanol o acetonitrilo. Los ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, y sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Los ejemplos de sales de adición de álcalis incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, sales de calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas, tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquil-etanolamina, triethanolamina y sales de aminoácidos básicas.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina o amorfa como compuestos libres o como solvatos (por ejemplo, hidratos) y se pretende que todas las formas estén dentro del alcance de la presente invención. Los métodos de solvatación generalmente son conocidos en la técnica.

La estereoisomería sobre los carbonos asimétricos con estereoquímica no especificada es posible, por lo tanto, en tales casos, los carbonos asimétricos pueden tener la configuración (*R*) o (*S*). Todos los diastereómeros generados por una configuración específica de dichos carbonos asimétricos junto con los demás carbonos asimétricos presentes en la molécula, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del alcance de la presente invención. La estereoisomería sobre el doble enlace (isomería geométrica) también es posible, por lo tanto, en algunos casos, la molécula podría existir como isómero (*E*) o isómero (*Z*). Si la molécula contiene varios enlaces dobles, cada enlace doble tendrá su propia estereoisomería, que podría ser el mismo o diferente a la estereoisomería de los demás dobles enlaces de la molécula. Además, los compuestos mencionados en el presente documento pueden existir como atropoisómeros. Los estereoisómeros individuales, incluidos los diastereoisómeros, los isómeros geométricos y los atropoisómeros de los compuestos a los que se hace referencia en el presente documento, y mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

Además, los compuestos mencionados en el presente documento pueden existir en formas marcadas isotópicamente. Todas las sales, ésteres y formas isotópicamente marcadas farmacéuticamente aceptables de los compuestos mencionados en el presente documento, y mezclas de los mismos, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas en el presente documento no están calificadas con el término "aproximadamente". Se entiende que, ya sea que el término "aproximadamente" se use explícitamente o no, cada cantidad dada en el presente documento se refiere al valor real dado, y también se refiere a la aproximación a dicho valor dado que razonablemente se podría inferir basándose en la experiencia habitual en la técnica, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor dado.

Una característica importante de los compuestos descritos anteriormente es su bioactividad y, en particular, su actividad citotóxica. En este sentido, se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos de la presente invención muestran una actividad antitumoral aumentada, como se muestra en los Ejemplos 4 y 6 a 8.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la forma de administración incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para permitir que un compuesto de acuerdo con la presente invención esté biodisponible tras la administración de la composición a un animal, preferiblemente un ser humano. Las composiciones pueden tener la forma de una o más dosis unitarias, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación única, y un recipiente de un compuesto de acuerdo con la presente invención puede contener el compuesto en forma líquida o en aerosol y puede contener una única o una pluralidad de unidades de dosificación.

El transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede estar en forma de partículas, de manera que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El vehículo o vehículos puede ser líquido, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el vehículo o vehículos pueden ser gaseosos o líquidos para proporcionar una composición de aerosol útil en, por ejemplo, la administración por inhalación. Los polvos también se pueden usar para formas de dosificación por inhalación. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra el compuesto de acuerdo con la presente invención. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, disacáridos y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administra a un animal, los compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención, y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo preferido cuando los compuestos de acuerdo con la presente invención se administran por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes, tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio,

monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

5 Cuando se pretende para la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen en las formas consideradas en el presente documento ya sea como sólido o como líquido.

10 Como una composición sólida para la administración oral, la composición puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido formado por compresión, píldora, cápsula, gomas de mascar, oblea o las formas similares. Dicha composición sólida contiene normalmente uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio; agente deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agente edulcorante tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja; y un agente colorante.

20 Cuando la composición está en forma de una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un transportador líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrinas o un aceite graso.

25 La composición puede estar en la forma de o un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión estériles. El líquido puede ser útil para la administración oral o para la administración mediante inyección. Cuando se pretende para la administración oral, una composición puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y un potenciador del aroma. En una composición para su administración mediante inyección se puede incluir, uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

30 La vía de administración preferida es la administración parenteral que incluye, pero sin limitación, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, intracerebral, intraventricular, intratecal, intravaginal o transdérmica. El modo de administración preferido se deja a la discreción del médico y dependerá en parte del sitio de la afección médica (tal como el sitio del cáncer). En una realización más preferida, los compuestos de acuerdo con la presente invención se administran por vía intravenosa. Se prefiere usar tiempos de infusión de hasta 24 horas, más preferiblemente de 1 a 12 horas, siendo mucho más preferido de 1 a 6 horas. Los tiempos de infusión cortos que permiten realizar el tratamiento sin pasar la noche en un hospital son especialmente deseables. Sin embargo, la infusión puede ser de 12 a 24 horas o incluso más si es necesario. La infusión se puede realizar a intervalos adecuados de, por ejemplo, de 1 a 4 semanas.

40 Las composiciones líquidas de la invención, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir también uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente suero salino fisiológico, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos, polietilenglicoles, glicerina, u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La composición parenteral se pueden introducir en una ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis hecho de vidrio, plástico u otro material. El suero salino fisiológico es un adyuvante preferible.

50 La cantidad de compuesto de acuerdo con la presente invención que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o dolencia concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en las composiciones dependerá también de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del especialista a cargo del tratamiento y de las circunstancias del paciente.

55 Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada. La dosificación correcta de los compuestos variará de acuerdo con la formulación particular, el modo de aplicación, y su sitio particular, el huésped y la enfermedad que se trata, por ejemplo, cáncer y si es así, qué tipo de tumor. Se deben tener en cuenta otros factores como la edad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, estado del huésped, combinaciones de fármaco, sensibilidades de reacción y la gravedad de la enfermedad. La administración se puede realizar de forma continua o periódica dentro de la dosis máxima tolerada.

65 Normalmente, la cantidad es al menos aproximadamente el 0,01 % de un compuesto de la presente invención, y puede comprender al menos el 80 %, en peso de la composición. Cuando se pretende para la administración oral, esta cantidad puede variarse para comprender de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 80 % en peso de la composición. Las composiciones orales preferidas pueden comprender de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 50 % del compuesto de la presente invención en peso de la composición.

Las composiciones preferidas de la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contenga de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 10 % en peso del compuesto de la presente invención. La unidad de dosificación parenteral más preferida contiene de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 5 % en peso del compuesto de la presente invención.

Para administración intravenosa, la composición es adecuada para dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal, y más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

El compuesto de la presente invención, puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la presente invención, o composiciones localmente en el área en necesidad de tratamiento. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico.

Se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético. En determinadas realizaciones, el compuesto de la presente invención se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos convencionales, tales como triglicéridos.

Las presentes composiciones pueden tener la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, microgránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizadores, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse usando metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición que se pretende administrar por inyección puede prepararse combinando un compuesto de la presente invención con agua u otro diluyente fisiológicamente adecuado, tal como en solución salina tamponada con fosfato, para formar una solución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea.

Las composiciones preferidas de acuerdo con la presente invención incluyen:

- Composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención y un disacárido. Los disacáridos particularmente preferidos se seleccionan de lactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celobiosa, isosacarosa, isotrehalosa, turanosa, melibiosa, gentiobiosa y mezclas de las mismas.
- Composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden un compuesto de la presente invención y un disacárido. Los disacáridos particularmente preferidos se seleccionan de lactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celobiosa, isosacarosa, isotrehalosa, turanosa, melibiosa, gentiobiosa y mezclas de las mismas.

La relación de la sustancia activa con respecto al disacárido en realizaciones de la presente invención se determina de acuerdo con la solubilidad del disacárido y, cuando la formulación se liofiliza, también de acuerdo con la capacidad de liofilización del disacárido. Se prevé que esta relación de sustancia activa:disacárido (p/p) puede ser de aproximadamente 1:10 en algunas realizaciones, de aproximadamente 1:20 en otras realizaciones, de aproximadamente 1:50 en todavía otras realizaciones. Se prevé que otras realizaciones tengan dichas relaciones en el intervalo de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:500, y todavía otras realizaciones tengan dichas relaciones en el intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:500.

La composición que comprende un compuesto de la presente invención puede liofilizarse. La composición que comprende un compuesto de la presente invención se presenta usualmente en un vial que contiene una cantidad específica de dicho compuesto.

Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención y las composiciones de la presente invención son particularmente eficaces en el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona un compuesto o composición para su uso como medicamento. La presente invención proporciona un compuesto o composición para su uso en el tratamiento del cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, sarcoma, cáncer de ovario y cáncer gástrico.

Por lo tanto, los compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención son útiles para inhibir la multiplicación, o proliferación, de una célula tumoral o célula cancerosa, o para tratar el cáncer en un animal.

Los compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención muestran una excelente actividad en el

tratamiento de cánceres tales como cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, sarcoma, cáncer de ovario y cáncer gástrico. Los cánceres más preferidos se seleccionan de cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal.

5

En la presente solicitud, por "cáncer" se entiende que incluye tumores, neoplasias y cualquier otra enfermedad neoplásica que tenga como causa tejido o células neoplásicas.

10 El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, salvo que se indique lo contrario, significa invertir, atenuar, aliviar o inhibir el progreso de la enfermedad o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, salvo que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar como "tratamiento" se define inmediatamente arriba.

15 Los compuestos y composiciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un animal que también se ha sometido a cirugía como tratamiento para el cáncer. En una realización de la presente invención, el método de tratamiento adicional es la radioterapia.

20 En una realización específica de la presente invención, el compuesto o composición de acuerdo con la presente invención se administra concurrentemente con radioterapia. En otra realización específica, la radioterapia se administra antes o después de la administración del compuesto o composición de la presente invención, preferiblemente al menos una hora, tres horas, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, más preferiblemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses) antes o después de la administración de un compuesto o composición de la presente invención.

25

Se puede usar cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del cáncer que se va a tratar. Por ejemplo, pero sin limitación, se puede administrar radiación de rayos x; en particular, Se pueden usar megatensiones de alta energía (radiación de más de 1 MeV de energía) para los tumores profundos, y se pueden usar haces de electrones y ortotensiones de radiación de rayos X para los cánceres de piel. También se pueden administrar radioisótopos emisores de rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos.

30

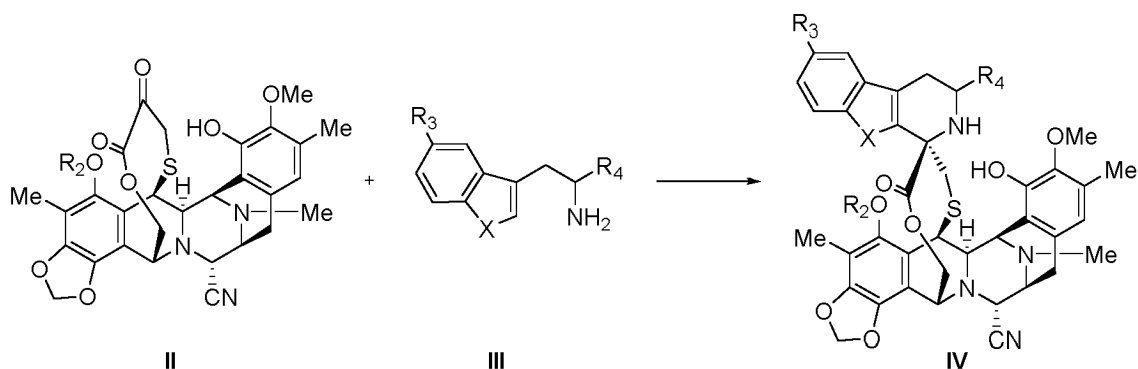
En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35

En una realización, el kit de acuerdo con esta realización es para su uso en el tratamiento del cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, sarcoma, cáncer de ovario y cáncer gástrico.

40

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para obtener un compuesto de fórmula V o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III para dar un compuesto de fórmula IV:



45

en la que:

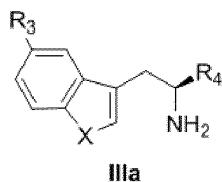
50 X es -O-;
 R₂ es acetilo;
 R₃ es hidrógeno;
 R₄ es -CH₂OH.

En una realización más preferida, el proceso comprende además la etapa de reemplazar el grupo ciano en el

compuesto de fórmula **IV** con un grupo hidroxilo para dar un compuesto de fórmula **V**.

Los procesos preferidos de acuerdo con la presente invención incluyen:

- 5 • Un proceso en el que el compuesto de fórmula **III** es un compuesto de fórmula **IIIa**:

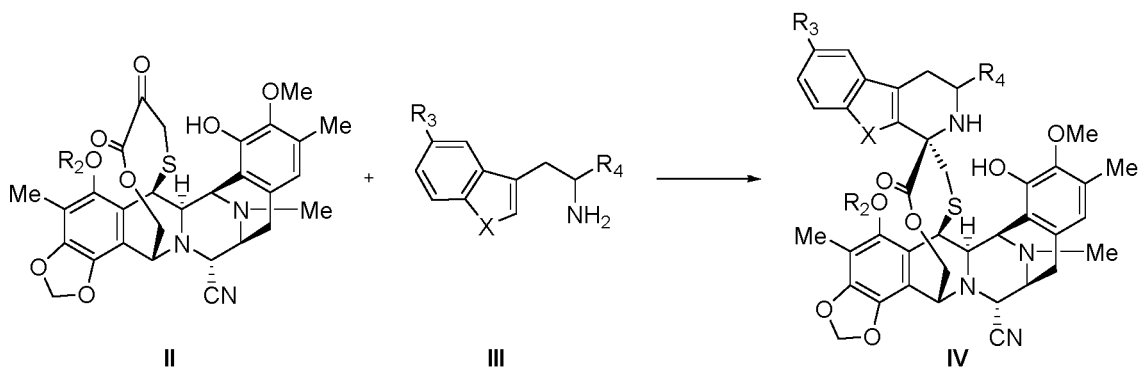


en la que

10

X es -O-;
R₃ es hidrógeno; y
R₄ es -CH₂OH.

- 15 En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un proceso para obtener un compuesto de fórmula **VI** o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula **II** con un compuesto de fórmula **III** para dar un compuesto de fórmula **IV**:



20

en la que:

25 X es -O-;
R₂ es acetilo;
R₃ es hidrógeno;
R₄ es hidrógeno.

En una realización más preferida, el proceso comprende además la etapa de reemplazar el grupo ciano en el compuesto de fórmula **IV** con un grupo hidroxilo para dar un compuesto de fórmula **VI**.

30

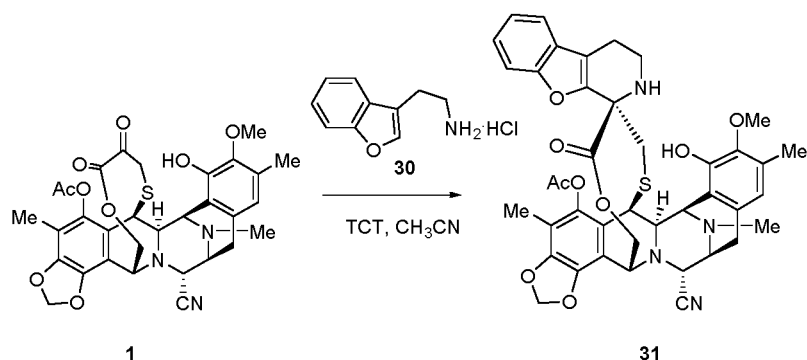
Ejemplos

El compuesto **1** se preparó como se describe en el Ejemplo 20 del documento WO 01/87895.

35 El compuesto de referencia **ET-736** se preparó como se describe en el documento WO 03/014127 (Compuesto **26**).

Ejemplo 1.

40 **A)**



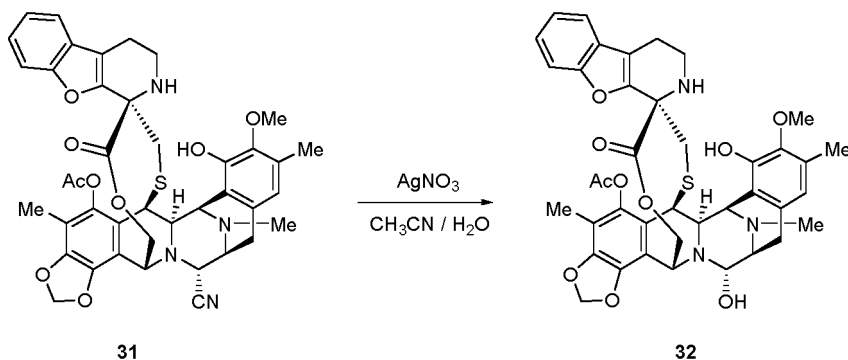
A una solución del compuesto **1** (2,0 g, 3,21 mmol) en acetonitrilo (200 ml, 0,01 M) se le añadieron clorhidrato de 2-benzofuran-3-il-etilamina (**30**) (1,90 g, 9,65 mmol, Sigma Aldrich) y cloruro cianúrico (TCT) (200 mg, 10 %). La mezcla de reacción se agitó a 85 °C durante 24 h y después se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. La cromatografía ultrarrápida (Hexano:EtOAc, de 9:1 a 1:9) da el compuesto **31** (1,95 g, 79 %).

$F_r = 0,5$ (Hexano:EtOAc, 1:1).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,36 (m, 2H), 7,19-7,10 (m, 2H), 6,64 (s, 1H), 6,20 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,05 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 5,76 (s, 1H), 5,05 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H), 4,54 (s, 1H), 4,33-4,24 (m, 2H), 4,23-4,16 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,49-3,38 (m, 2H), 3,28-3,21 (m, 1H), 3,06-2,78 (m, 5H), 2,57-2,50 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,21 (m, 3H), 2,08 (s, 3H).

ESI-MS m/z : 765,3 (M+H)⁺.

B)



A una solución del compuesto **31** (380 mg, 0,49 mmol) en CH₃CN:H₂O (1,39:1,25 ml, 0,015 M) se le añadió AgNO₃ (1,30 g, 7,45 mmol). Después de 5 h a 23 °C, se añadió una mezcla 1:1 de soluciones acuosas saturadas de NaCl y NaHCO₃, se agitó durante 15 min, se diluyó con CH₂Cl₂, se agitó durante 5 min, y se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida (CH₂Cl₂:CH₃OH, de 99:1 a 85:15) para proporcionar el compuesto **32** (175 mg, 47 %).

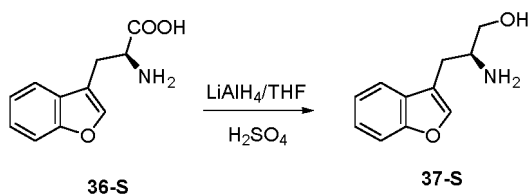
$F_r = 0,40$ (CH₂Cl₂:CH₃OH, 9:1).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,35 (ddd, $J = 10,7, 7,6, 1,1$ Hz, 2H), 7,14 (dtd, $J = 19,7, 7,3, 1,3$ Hz, 2H), 6,65 (s, 1H), 6,16 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,01 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 5,75 (s, 1H), 5,15 (dd, $J = 11,5, 1,2$ Hz, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,48 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 4,44 (s, 1H), 4,20-4,06 (m, 2H), 3,81 (s, 1H), 3,50 (d, $J = 18,8$ Hz, 1H), 3,30 (ddd, $J = 12,6, 7,9, 5,1$ Hz, 1H), 3,22 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 2,99 (d, $J = 17,9$ Hz, 1H), 2,84 (dd, $J = 19,2, 12,0$ Hz, 3H), 2,59-2,49 (m, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,21-2,14 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,06 (s, 3H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 171,2, 168,7, 154,4, 150,0, 147,9, 145,5, 142,9, 140,9, 140,8, 131,3, 129,0, 127,7, 123,7, 122,2, 121,2, 120,8, 118,9, 118,3, 115,5, 113,5, 111,7, 101,7, 82,1, 62,7, 61,7, 60,3, 57,8, 57,4, 55,9, 55,0, 42,2, 41,3, 39,7, 38,2, 29,7, 23,7, 21,3, 20,6, 15,9, 9,7. ESI-MS m/z : 738,6 (M-H₂O+H)⁺.

(+)-HR-ESI-TOF-MS m/z : 756,2654 [M+H]⁺ (Calc. para C₄₀H₄₂N₃O₁₀S 756,2585).

Ejemplo 2



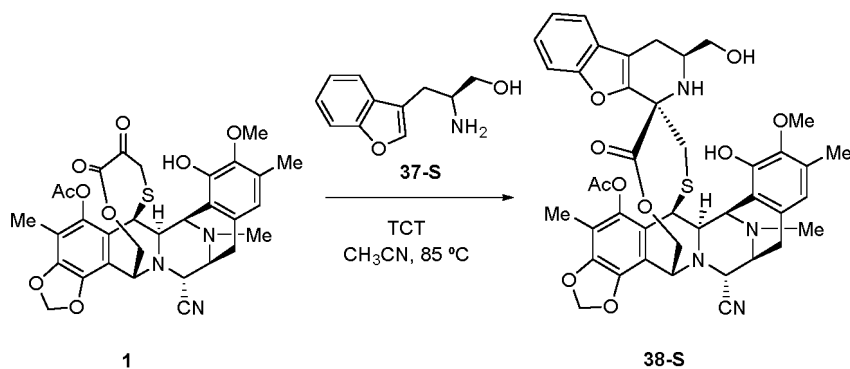
A una solución de LiAlH_4 (148 ml, 1,0 M en THF, 148 mmol) a -40°C se le añadió cuidadosamente H_2SO_4 (7,14 ml, 72,9 mmol) y una suspensión de ácido (S)-2-amino-3-(benzofuran-3-il)propanoico (**36-S**) (preparado como se describe en Tetrahedron Asymmetry 2008, 19, 500-511) (5,54 g, 26,9 mmol) en THF (85 ml, 0,003 M). La mezcla de reacción se dejó desprender a 23°C , se calentó a 80°C durante 3 h y 18 h a 23°C . Se enfrió a -21°C y la mezcla de reacción se inactivó cuidadosamente con NaOH 2 N hasta un pH básico. Se añadió EtOAc y la mezcla se filtró a través de Celite® y se lavó con CH_3OH . El producto en bruto se concentró al vacío para proporcionar el compuesto **37-S** (3,93 g, >100 %).

$F_r = 0,1$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 4:1).

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,67 - 7,62 (m, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,51 - 7,41 (m, 1H), 7,34 - 7,18 (m, 2H), 3,69 - 3,48 (m, 1H), 3,44 (dd, $J = 10,8, 6,6$ Hz, 1H), 3,18 (dtd, $J = 7,4, 6,4, 4,6$ Hz, 1H), 2,88 (ddd, $J = 14,4, 6,1, 1,0$ Hz, 1H), 2,68 (ddd, $J = 14,4, 7,5, 0,9$ Hz, 1H).

Ejemplo 3

A)



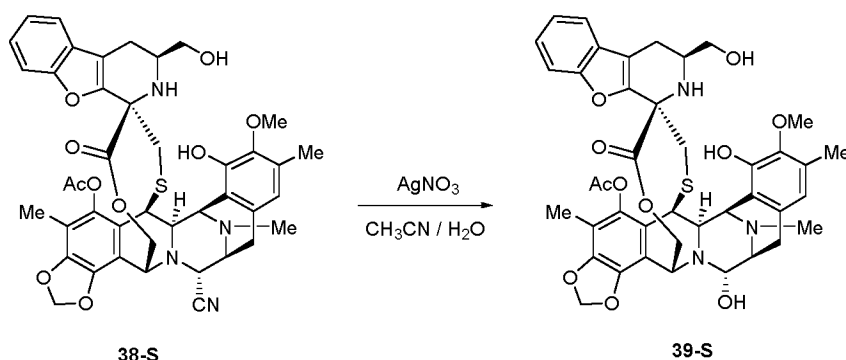
A una solución del compuesto **1** (850 mg, 1,36 mmol) en CH_3CN (136 ml, 0,01 M) se le añadió (S)-2-amino-3-(benzofuran-3-il)propan-1-ol (**37-S**) (1,30 g, 6,83 mmol) y cloruro cianúrico (TCT) (170 mg, 20 %). La mezcla de reacción se agitó a 85°C durante 24 h y después se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. La cromatografía ultrarrápida (Hexano:EtOAc, de 9:1 a 1:9) da el compuesto **38-S** (750 mg, 69 %).

$F_r = 0,25$ (Hexano:EtOAc, 1:1).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,39 - 7,33 (m, 1H), 7,33 - 7,29 (m, 1H), 7,20 (ddd, $J = 8,3, 7,2, 1,4$ Hz, 1H), 7,14 (td, $J = 7,4, 1,0$ Hz, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,21 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 6,06 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 5,74 (s, 1H), 5,08 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H), 4,58 (s, 1H), 4,37 (s, 1H), 4,32 - 4,23 (m, 2H), 4,19 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,52 - 3,41 (m, 3H), 3,36 - 3,29 (m, 1H), 3,13 (d, $J = 9,8$ Hz, 1H), 3,00 - 2,81 (m, 3H), 2,57 (dd, $J = 15,7, 4,9$ Hz, 1H), 2,50 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H), 2,37 (s, 3H), 2,31 - 2,25 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,10 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 2,05 (s, 3H).

ESI-MS m/z : 795,2 (M)⁺.

B)



A una solución del compuesto **38-S** (890 mg, 1,12 mmol) en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1,39:1, 75 ml, 0,015 M) se le añadió AgNO_3 (4,70 g, 28,0 mmol). Después de 18 h a 23 °C, se añadió una mezcla 1:1 de soluciones acuosas saturadas de NaCl y NaHCO_3 , se agitó durante 15 min, se diluyó con CH_2Cl_2 , se agitó durante 5 min, y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía ultrarrápida ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, de 99:1 a 85:15) para proporcionar el compuesto **39-S** (500 mg, 57 %).

$F_r = 0,30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,38 - 7,33 (m, 1H), 7,33 - 7,28 (m, 1H), 7,23 - 7,16 (m, 1H), 7,16 - 7,09 (m, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,18 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 6,03 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,19 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,49 (s, 2H), 4,24 - 4,10 (m, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,54 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 3,49 (d, $J = 2,3$ Hz, 3H), 3,33 (t, $J = 10,1$ Hz, 2H), 3,22 (s, 1H), 2,98 (s, 1H), 2,84 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,62 - 2,53 (m, 2H), 2,37 (s, 3H), 2,30 - 2,24 (m, 1H), 2,28 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,04 (s, 3H).

^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3): δ 172,0, 170,7, 156,1, 150,6, 149,9, 147,1, 145,0, 142,4, 142,2, 132,0, 131,4, 128,7, 125,5, 123,8, 122,6, 121,6, 120,1, 116,5, 114,4, 112,3, 103,5, 92,6, 66,0, 65,1, 62,2, 60,4, 59,7, 56,6, 56,1, 54,8, 54,1, 51,6, 44,0, 41,3, 38,3, 30,8, 24,8, 20,6, 16,3, 9,6. ESI-MS m/z : 768,2 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$) $^+$.

(+)-HR-ESI-TOF-MS m/z : 768,2652 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}$] $^+$ (Calc. para $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$ 768,2585)

Ejemplo 4. Bioensayos *in vitro* para la detección de la actividad antitumoral

El objetivo de este ensayo es evaluar la actividad citostática *in vitro* (capacidad de retrasar o detener el crecimiento de células tumorales) o citotóxica (capacidad de destruir células tumorales) de las muestras que se están ensayando.

LÍNEAS CELULARES

| Nombre | N.º ATCC | Especie | Tejido | Características |
|------------|--------------|------------|----------|-----------------------------|
| A549 | CCL-185 | ser humano | pulmón | carcinoma de pulmón (NSCLC) |
| HT29 | HTB-38 | ser humano | colon | adenocarcinoma colorrectal |
| MDA-MB-231 | HTB-26 | ser humano | mama | adenocarcinoma de mama |
| PSN1 | CRM-CRL-3211 | ser humano | páncreas | adenocarcinoma de páncreas |
| PC-3 | CRL-1435 | ser humano | próstata | adenocarcinoma de próstata |
| 22Rv1 | CRL-2505 | ser humano | próstata | carcinoma de próstata |

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA UTILIZANDO LOS ENSAYOS COLORIMÉTRICOS DE SBR Y MTT

Se ha adaptado un ensayo colorimétrico, utilizando una reacción de sulforodamina B (SRB) para proporcionar una medición cuantitativa del crecimiento y la viabilidad celular (siguiendo la técnica descrita por Skehan et al. J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107-1112). Otro ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un formazán púrpura se ha utilizado para evaluar la actividad antiproliferativa (siguiendo la técnica descrita por Mosmann et al. J. Immunol. Meth. 1983, 65, 55-63).

Estas formas de ensayo emplean microplacas de cultivo celular de 96 pocillos siguiendo los estándares del American National Standards Institute and the Society for Laboratory Automation and Screening (ANSI SLAS 1-2004 (R2012) 10/12/2011). Todas las líneas celulares utilizadas en este estudio se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se derivan de diferentes tipos de cáncer humano.

Las células A549, HT29, MDA-MB-231 y PSN1 se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) mientras que las células PC-3 y 22Rv1 se mantuvieron en medio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Todas las líneas celulares se complementaron con suero bovino fetal (FBS) al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, y estreptomina 100 U/ml a 37 °C, CO_2 al 5 % y 98 % de humedad. Para los experimentos, las células se recogieron a partir de cultivos subconfluentes utilizando tripsinización y se resuspendieron en medio fresco antes del recuento y

la colocación en placas.

5 Las células A549, HT29, MDA-MB-231 y PSN1 se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos, a 5000 células por pocillo en alícuotas de 150 μ l, y se dejaron unir a la superficie de la placa durante 18 horas (durante una noche) en el medio libre de fármaco. Después de eso, una placa de control (sin tratar) de cada línea celular se fijó (como se describe a continuación) y se usó para el valor de referencia de tiempo cero. Después, las placas de cultivo se trataron con compuestos de prueba (alícuotas de 50 μ l de soluciones madre 4X en medio de cultivo completo más DMSO al 4 %) utilizando diez diluciones en serie 2/5 (concentraciones que varían de 10 a 0,003 μ g/ml) y cultivos por triplicado (concentración final al 1 % en DMSO). Después de 72 horas de tratamiento, el efecto antitumoral se midió utilizando la metodología SRB: En resumen, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron durante 15 minutos en solución de glutaraldehído al 1 % a temperatura ambiente, se aclararon dos veces en PBS y se tiñeron en una solución al 0,4 % de SRB durante 30 min a temperatura ambiente. Después, las células se aclararon varias veces con una solución de ácido acético al 1 % y se secaron al aire a temperatura ambiente. Después, se extrajo SRB en una solución de base de trizma 10 mM y se midió la absorbancia en un lector de placas espectrofotométrico automatizado a 490 nm.

20 Un número apropiado de células PC-3 y 22Rv1, para alcanzar una densidad celular final en el ensayo que varía de 5.000 a 15.000 células por pocillo, dependiendo de la línea celular, se sembró en placas de 96 pocillos y se dejó en reposo en medio de cultivo durante 24 h a 37 °C bajo CO₂ al 5 % y un 98 % de humedad. Después, se añadieron compuestos o DMSO en medio de cultivo para alcanzar un volumen final de 200 μ l y la concentración de compuesto prevista en un intervalo que abarcaba diez diluciones en serie 2/5 a partir de 0,1 μ g/ml en DMSO al 1 % (v/v). En este punto, se procesó un conjunto de "placas de control de tiempo cero" tratadas con DMSO al 1 % (v/v) con MTT como se describe a continuación. El resto de las placas se incubaron durante 72 h en las condiciones ambientales mencionadas anteriormente. Posteriormente, se añadieron 50 μ l de una solución de MTT de 1 mg/ml en medio de cultivo a los pocillos y se incubaron durante 6-8 horas a 37 °C para permitir la generación de cristales de formazán. Después, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 μ l de DMSO puro a cada pocillo para disolver el producto de formazán en una solución coloreada cuya absorbancia a 540 nm finalmente se midió en un lector multietiqueta de microplacas PolarStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

30 Los efectos sobre el crecimiento y la supervivencia celular se estimaron aplicando el algoritmo NCI (Boyd MR y Paull KD. Drug Dev. Res. 1995, 34, 91-104).

35 Los valores obtenidos en cultivos por triplicado se ajustaron mediante regresión no lineal a una curva logística de cuatro parámetros mediante análisis de regresión no lineal. Se calcularon tres parámetros de referencia (de acuerdo con el algoritmo NCI mencionado anteriormente) mediante la interpolación automática de las curvas obtenidas mediante dicho ajuste: GI₅₀ = concentración de compuesto que produce una inhibición del crecimiento celular al 50 %, en comparación con los cultivos de control; TGI = inhibición del crecimiento celular total (efecto citostático), en comparación con los cultivos de control, y LC₅₀ = concentración del compuesto que produce un efecto citotóxico de destrucción celular neto al 50 %).

40 Las Tablas 1-2 ilustran datos sobre la actividad biológica de los compuestos de la presente invención junto con la actividad biológica de los compuestos de referencia. Los compuestos **C** y **ET-736** no forman parte de la presente invención.

Tabla 1. Actividad biológica (Molar)

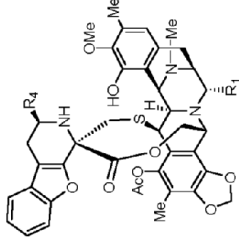
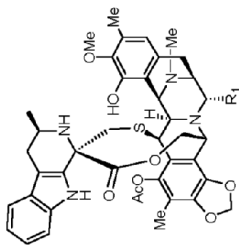
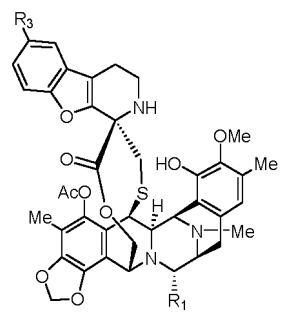
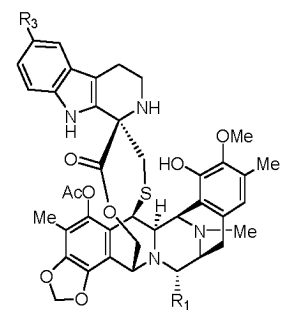
| Compuesto | | Compuesto de referencia | | | | | | | | |
|--|-------------|--|-------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|
|  <p>39-S R₁ = OH, R₄ = -CH₂OH</p> | |  <p>C R₁ = OH</p> | | | | | | | | |
| | A549 | HT29 | MDA-MB-231 | PSN1 | PC-3 | 22RV1 | A549 | HT29 | MDA-MB-231 | PSN1 |
| GI₅₀ | 4,84E-09 | 3,94E-09 | 3,44E-09 | 8,02E-09 | 2,78E-09 | 4,81E-10 | 2,73E-08 | 2,08E-08 | 2,60E-08 | 3,64E-08 |
| TGI | 8,27E-09 | 6,74E-09 | 7,13E-09 | 1,02E-08 | | | 6,63E-08 | 2,34E-08 | 5,46E-08 | 4,42E-08 |
| LC₅₀ | 1,65E-08 | >1,27E-07 | 1,78E-08 | 1,27E-08 | | | >1,30E-07 | >1,30E-07 | >1,30E-07 | 6,50E-08 |

Tabla 2. Actividad biológica (Molar)

| | | Compuesto | | | | Compuesto de referencia | | | | |
|------------------|----|---|-----------|------------|----------|--|-----------|-----------|------------|----------|
| | |  <p>32 R₁ = OH, R₃ = H</p> | | | |  <p>ET-736 R₁ = OH, R₃ = H</p> | | | | |
| | | A549 | HT29 | MDA-MB-231 | PSN1 | | A549 | HT29 | MDA-MB-231 | PSN1 |
| GI ₅₀ | 32 | 6,88E-09 | 6,88E-09 | 4,76E-09 | 6,09E-09 | ET-736 | 2,25E-08 | 2,12E-08 | 2,12E-08 | 3,97E-08 |
| TGI | | >1,32E-08 | >1,32E-08 | 1,05E-08 | 8,34E-09 | | 4,77E-08 | 2,25E-08 | 2,52E-08 | 5,96E-08 |
| LC ₅₀ | | >1,32E-08 | >1,32E-08 | >1,32E-08 | 1,20E-08 | | >1,32E-07 | >1,32E-07 | 4,77E-08 | 1,02E-07 |

Se demuestra que los compuestos de la presente invención tienen alta potencia *in vitro*, en comparación con los compuestos de referencia. Esto demuestra que los compuestos de acuerdo con la presente invención presentan una alta citotoxicidad hacia las células cancerosas y son útiles en el tratamiento del cáncer.

Ejemplo 5. Determinación de MTD y MTMD

Se utilizaron ratones hembra CD-1 o atímicos Nude-Foxl nu/nu (Envigo) para todos los experimentos. Los animales (N = 10/jaula) se alojaron en jaulas ventiladas individualmente (Sealsafe Plus®, Techniplast S.P.A.), en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a 21-23 °C y un 40-60 % de humedad. A los ratones se les permitió acceso libre a la dieta de roedores estándar irradiada (Tecklad 2914C) y agua esterilizada. Los animales se aclimataron durante cinco días antes de identificarse individualmente con tatuajes. Los protocolos para animales se revisaron y aprobaron de acuerdo con los regional Institutional Animal Care and Use Committees.

Los ratones se asignaron al azar en grupos experimentales y se administraron por vía intravenosa, una vez para la determinación de la MTD (dosis máxima tolerada) o una administración por semana durante tres semanas consecutivas, para el estudio de determinación de la MTMD (dosis múltiple máxima tolerada). A los animales se les administró una formulación blanca o un compuesto disuelto en la formulación experimental a diferentes concentraciones. El volumen administrado fue siempre de 10 ml/kg. Una vez administrados, los animales se controlaron para determinar los signos clínicos de toxicidad sistémica, cambios en el peso corporal y mortalidad hasta 14 días después de la administración.

Los resultados de la MTD se resumen en la **Tabla 3**

Tabla 3

| Compuesto | Ruta/Programación | Dosis (mg/Kg) | MTD (mg/kg) |
|-----------|-------------------|--|-------------|
| Comp. C | iv/DE | 0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 3,00, 4,00, 5,00 | 3,0 |
| 32 | | 0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50, 5,00 | 0,5 |

Los resultados de la MTMD se resumen en la **Tabla 4**

Tabla 4

| Compuesto | Ruta/Programación | Dosis (mg/Kg) | MTMD (mg/kg) |
|-----------|-------------------|--|--------------|
| Comp. C | iv/Q7dx3 | 0,0, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 | 3,0 |
| 32 | | 0,00, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 | 0,5 |
| 39-S | | 0,00, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 2,00, 2,50, 5,00 | 1,25 |
| ET-736 | | 0,00, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 | 0,5 |

(continuación)

| Compuesto | Ruta/Programación | Dosis (mg/Kg) | MTMD (mg/kg) |
|---|-------------------|---------------|--------------|
| iv, intravenosa Q7dx3, tres dosis acumuladas administradas semanalmente. | | | |

Ejemplos 6-8. Xenoinjertos *in vivo*

- 5 Se utilizaron ratones atímicos nu/nu hembra (Harlan Laboratories Models, S.L. Barcelona, España o Envigo, España) para todos los experimentos. Los animales se alojaron en jaulas con ventilación individual Sealsafe® Plus, Techniplast S.P.A.), hasta diez por jaula en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a 21-23 °C y un 40-60 % de humedad. A los ratones se les permitió acceso libre a la dieta de roedores estándar irradiada (Tecklad 2914C) y agua esterilizada. Los animales se aclimataron durante al menos 5 días antes de la implantación del tumor con una suspensión de células tumorales.

LÍNEAS CELULARES

| Nombre | N.º ATCC | N.º ECCC* | Especie | Tejido | Características |
|------------|----------|-----------|------------|--|---------------------------|
| HT1080 | CCL-121 | - | ser humano | conectivo | Fibrosarcoma |
| MDA-MB-231 | HTB-26 | - | ser humano | mama | Adenocarcinoma de mama |
| H460 | HTB-177 | - | ser humano | pulmón, derrame pleural | NSCLC |
| A2780 | - | 93112519 | ser humano | ovario | Carcinoma de ovario |
| HGC27 | - | 94042256 | ser humano | gástrico | Carcinoma gástrico |
| H526 | CRL-5811 | - | ser humano | pulmón | SCLC |
| H82 | HTB-175 | - | ser humano | pulmón | SCLC |
| PC3 | CLR-1435 | - | ser humano | próstata; derivado de sitio metastásico: hueso | Adenocarcinoma prostático |
| DU145 | HTB-81 | - | ser humano | próstata; derivado de sitio metastásico: cerebro | Carcinoma prostático |
| 22Rv1 | CRL-2505 | - | ser humano | próstata | Carcinoma prostático |

* Colección Europea de cultivos celulares

- 15 Las células HT1080 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio Eagle esencial mínimo (MEME) (Sigma-Aldrich, Co). A cada animal se le implantaron por vía ortotópica en el músculo gastrocnemio mediante una inyección intramuscular utilizando una aguja 26G y una jeringa de 1 cc a las 4-6 semanas de edad, 10x10⁶ células HT1080, suspendidas en medio sin suero, sin antibióticos.

- 20 Las células MDA-MB-231 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio Eagle modificado de Dulbecco (Sigma-Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días al alcanzar la confluencia. A cada animal se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 7,5x10⁶ células MDA-MB-231 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

- 25 Las células H460 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio Eagle modificado de Dulbecco (Sigma-Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días al alcanzar la confluencia. A cada animal se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 5x10⁶ células H460 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

- 30 Las células A2780 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días al alcanzar la confluencia. A cada animal se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 10x10⁶ células A2780 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

- 40 Las células HGC27 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio de Dulbecco modificado por Iscove (Sigma Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días al alcanzar la confluencia. A cada animal se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 5x10⁶ células HGC-27 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences), medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

Las células H526 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Las células

H526 se cultivaron como una suspensión y se mantuvieron mediante la adición de medio fresco, a medida que aumenta la densidad celular, cada 2 a 3 días. Cada semana, se restableció el cultivo mediante centrifugación de la suspensión con resuspensión posterior en medio fresco a una concentración de 1×10^5 células/ml. A cada animal se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 5×10^6 células H526 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

Las células H82 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Las células H82 se cultivaron como una suspensión y se mantuvieron mediante la adición de medio fresco, a medida que aumenta la densidad celular, cada 2 a 3 días. Cada semana, se restableció el cultivo mediante centrifugación de la suspensión con resuspensión posterior en medio fresco a una concentración de 1×10^5 células/ml. A los animales se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 5×10^6 células H82 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

Las células PC3 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días al alcanzar la confluencia. A cada ratón atímico hembra se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 3×10^6 células PC3 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en matriz Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos. En este modelo, en lugar de machos, se usaron hembras porque el crecimiento de PC-3 no depende de las hormonas.

Las células DU-145 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días tras alcanzar la confluencia. A cada ratón atímico macho se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 5×10^6 células DU-145 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en matriz Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

Las células 22Rv1 se mantuvieron *in vitro* a 37 °C con CO₂ al 5 % en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Co). Las células de cultivo se pasaron cada 3 a 5 días al alcanzar la confluencia. A cada ratón atímico macho se le implantaron por vía subcutánea (en el costado derecho con una aguja 26G y una jeringa de 1 cc) a las 4-6 semanas de edad, 5×10^6 células 22Rv1 suspendidas en 0,05 ml de una solución que consistía en matriz Matrigel® al 50 % (Corning Incorporated Life Sciences) y medio al 50 % sin suero ni antibióticos.

La tolerabilidad del tratamiento se evaluó controlando la evolución del peso corporal, los signos clínicos de toxicidad sistémica, así como las evidencias de daño local en el lugar de inyección.

En estudios de xenoinjerto con la línea celular HT1080:

- Las mediciones del diámetro total (tumor + pierna) se determinaron utilizando un calibrador digital (Fowler Sylvac, S235PAT). Este diámetro total y el peso corporal de los animales se midieron 2-3 veces por semana a partir del primer día de tratamiento (día 0).
- Cuando el diámetro total alcanzó una longitud de aproximadamente 7,0-8,0 mm, los ratones se asignaron al azar en los grupos de tratamiento y control (N = 8-10/grupo) según el peso corporal y las mediciones del tumor mediante el uso del software NewLab Oncology (versión 2.25.06.00).
- La comparación del diámetro total medio (tumor + pata) en los grupos de tratamiento con respecto al diámetro total medio (tumor + pata) en el grupo control se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral.
- Los animales se sacrificaron cuando el diámetro total de sus patas alcanzó aprox. 18 mm.

En estudios de xenoinjerto con otras líneas celulares:

- El volumen tumoral se calculó utilizando la ecuación $(a \cdot b^2)/2$, donde a: longitud (diámetro más largo) y b: ancho (diámetro más corto) se midieron en mm utilizando un calibrador digital (Fowler Sylvac, S235PAT). Las dimensiones tumorales y el peso corporal se registraron 2-3 veces por semana a partir del primer día de tratamiento.
- Cuando los tumores alcanzaron aprox. 150-250 mm³, se asignaron al azar animales portadores de tumor (N = 8-10/grupo) en los grupos de tratamiento, según el peso corporal y las mediciones de tumores mediante el uso del software de NewLab Oncology (versión 2.25.06.00).
- La comparación entre el volumen tumoral medio de los grupos tratados y el grupo control se utilizó para evaluar la eficacia antitumoral.
- Los animales se sacrificaron cuando sus tumores alcanzaron aprox. 2000 mm³ y/o se observó necrosis severa.

Los tratamientos que producen >20 % de letalidad y/o el 20 % de pérdida de peso corporal neto se consideraron tóxicos.

5 Las tablas y figuras resumen los datos obtenidos de grupos experimentales completos, es decir, aquellos grupos que mantienen el número inicial de animales, n = 8-10. Sin embargo, una vez que se sacrifica el primer animal debido a una longitud tumoral >18 mm o un tamaño del tumor >2000 mm³, el grupo experimental se considerará incompleto. Por lo tanto, los datos generados posteriormente al día del sacrificio y en adelante no se presentarán (es decir, ni en las tablas ni en las figuras).

10

Ejemplo 6. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en varios modelos de xenoinjerto.

El compuesto **39-S** y **C** se proporcionaron en forma de viales liofilizados de producto liofilizado. Cada vial se reconstituyó con agua estéril para inyección hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se realizaron diluciones adicionales con una solución al 5 % de dextrosa para inyección hasta la concentración de la formulación de dosificación. Las dosis administradas de **39-S** y **C** fueron 1,25 y 3 mg/kg, respectivamente.

15

El placebo se proporcionó en forma de viales de producto liofilizado. Cada vial (sacarosa 200 mg + dihidrogenofosfato de potasio 13,6 mg + ácido fosfórico c.s., pH 3,8-4,5) se reconstituyó con agua estéril para inyección (2 ml). Se realizaron diluciones adicionales con una solución al 5 % de dextrosa para inyección.

20

En estos experimentos, **39-S** y el compuesto **C**, así como el placebo, se administraron por vía intravenosa en un horario semanal a un volumen de 10 ml/kg.

25 **Ejemplo 6a.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en xenoinjertos de fibrosarcoma humano.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antitumoral del compuesto **39-S** mediante la comparación con la actividad antitumoral del compuesto **C** usando un modelo de xenoinjerto de sarcoma humano.

30 El modelo tumoral usado en este estudio fue la línea celular HT1080.

La **Tabla 5** informa de la evaluación del diámetro total (tumor + pata) de tumores HT1080 en ratones tratados con placebo, compuesto **C** y **39-S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 1**.

35

Tabla 5

| Días | Diámetro total (tumor + pata) (mm) | | |
|------|------------------------------------|------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |
| 2 | 9,4 | 7,9 | 8,8 |
| 5 | 11,4 | 6,4 | 9,0 |
| 7 | 12,1 | 6,8 | 9,6 |
| 9 | 13,2 | 6,9 | 10,2 |
| 12 | 14,5 | 6,6 | 10,2 |
| 14 | 15,2 | 6,4 | 11,2 |
| 16 | 15,9 | 6,8 | 12,4 |
| 19 | 18,0 | 7,0 | 13,3 |
| 21 | | 7,0 | 15,2 |
| 23 | | 8,5 | 18,0 |
| 27 | | 10,8 | |
| 30 | | 12,5 | |
| 33 | | 14,3 | |
| 35 | | 15,3 | |
| 37 | | 18,0 | |

Ejemplo 6b. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en xenoinjertos de adenocarcinoma de mama humano.

40 El objetivo de este estudio fue comparar las actividades antitumorales de **39-S** y el compuesto **C** usando un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano.

El modelo tumoral usado en este estudio fue la línea celular MDA-MB-231.

La **Tabla 6** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores MDA-MB-231 en ratones tratados con placebo, compuesto **C** y **39-S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 2**.

5

Tabla 6.

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 149,4 | 151,0 | 149,4 |
| 2 | 240,0 | 209,3 | 217,1 |
| 5 | 325,1 | 290,9 | 281,3 |
| 7 | 407,8 | 301,8 | 338,6 |
| 9 | 514,8 | 300,8 | 385,1 |
| 12 | 648,1 | 278,7 | 400,4 |
| 14 | 799,0 | 249,7 | 436,9 |
| 16 | 1002,5 | 243,6 | 585,7 |
| 19 | 1233,9 | 248,3 | 774,7 |
| 21 | 1539,1 | 250,0 | 965,9 |
| 23 | 2006,5 | 260,3 | 1215,2 |
| 26 | 2027,7 | 304,9 | 1503,2 |
| 28 | | 337,1 | 1785,3 |
| 30 | | 451,3 | 2037,1 |
| 33 | | 584,1 | |
| 35 | | 683,4 | |
| 37 | | 784,7 | |
| 40 | | 937,4 | |
| 42 | | 1060,5 | |
| 44 | | 1170,5 | |
| 47 | | 1112,9 | |
| 49 | | 1138,6 | |
| 51 | | 1283,2 | |
| 54 | | 1415,1 | |
| 56 | | 1518,7 | |
| 58 | | 1728,5 | |
| 61 | | 2017,9 | |

Ejemplo 6c. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en xenoinjertos de cáncer de pulmón humano.

10 El objetivo de este estudio fue comparar la actividad antitumoral de **39-S** con la actividad antitumoral del compuesto **C** usando tres modelos de xenoinjertos diferentes de cáncer de pulmón humano. Estos modelos corresponden a cáncer de pulmón de células no pequeñas (línea celular H-460) y a cáncer de pulmón de células pequeñas (líneas celulares H526 y H82).

15 La **Tabla 7** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores H460 en ratones tratados con placebo, compuesto **C** y **39-S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 3**.

Tabla 7

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 187,4 | 187,8 | 186,1 |
| 2 | 577,5 | 314,4 | 395,4 |
| 5 | 1352,0 | 584,1 | 665,9 |
| 7 | 1642,9 | 831,2 | 929,5 |
| 9 | 2025,0 | 841,0 | 1063,7 |
| 12 | | 1008,0 | 1436,5 |

(continuación)

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 14 | | 1309,8 | 2025,0 |
| 16 | | 1470,0 | 2025,0 |
| 19 | | 2025,0 | |

La **Tabla 8** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores H526 en ratones tratados con placebo, compuesto **C** y **39-S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 4**.

5

Tabla 8

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|-------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 217,2 | 214,5 | 217,9 |
| 2 | 410,7 | 260,3 | 262,4 |
| 4 | 778,5 | 80,0 | 108,3 |
| 7 | 1083,2 | 46,2 | 129,8 |
| 9 | 1371,0 | 32,0 | 85,9 |
| 11 | 1782,0 | 32,0 | 52,3 |
| 14 | 2025,0 | 4,0 | 54,1 |
| 16 | | 4,0 | 47,3 |
| 21 | | 4,0 | 4,0 |
| 28 | | 4,0 | 4,0 |
| 35 | | 4,0 | 4,0 |
| 42 | | 4,0 | 62,5 |
| 49 | | 4,0 | 53,5 |
| 56 | | 4,0 | 70,0 |
| 63 | | 4,0 | 132,3 |
| 70 | | 4,0 | 368,5 |
| 77 | | 4,0 | 465,8 |
| 84 | | 4,0 | 107,4 |
| 91 | | 4,0 | 130,0 |
| 98 | | 4,0 | 4,0 |
| 105 | | 4,0 | 4,0 |
| 112 | | 4,0 | 4,0 |
| 119 | | 4,0 | 4,0 |
| 126 | | 4,0 | 4,0 |
| 133 | | 4,0 | 4,0 |
| 140 | | 4,0 | 4,0 |
| 147 | | 4,0 | 4,0 |
| 165 | | 4,0 | 4,0 |
| 175 | | 4,0 | 4,0 |
| 191 | | 4,0 | 4,0 |
| 205 | | 4,0 | 4,0 |

La **Tabla 9** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores H82 en ratones tratados con placebo, compuesto **C** y **39-S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 5**.

10

Tabla 9.

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|-------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 171,6 | 170,3 | 170,5 |

(continuación)

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 2 | 439,4 | 325,2 | 265,3 |
| 5 | 1024,7 | 430,8 | 488,7 |
| 7 | 1422,0 | 466,2 | 760,0 |
| 9 | 1923,8 | 544,3 | 899,5 |
| 12 | 2025,0 | 640,3 | 1038,5 |
| 14 | | 711,2 | 1213,4 |
| 16 | | 802,7 | 1256,4 |
| 19 | | 916,0 | 1741,5 |
| 21 | | 1047,2 | 1878,8 |
| 23 | | 1189,1 | 2057,0 |
| 26 | | 1497,2 | |
| 28 | | 1741,8 | |
| 30 | | 1731,7 | |
| 33 | | 2029,4 | |

Ejemplo 6d. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en xenoinjertos de tumor de ovario humano.

- 5 El objetivo de este estudio fue comparar la actividad antitumoral de **39-S** con la actividad antitumoral del compuesto **C** usando un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano.

El modelo tumoral usado en este estudio fue A2780.

- 10 La **Tabla 10** informa de la evaluación del volumen de tumores A2780 en ratones tratados con placebo, compuesto **C** y **39S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 6**.

Tabla 10

| Día | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|-----|--|--------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 169,5 | 170,5 | 169,6 |
| 2 | 317,5 | 206,5 | 206,3 |
| 5 | 758,9 | 163,4 | 372,7 |
| 7 | 1351,9 | 298,6 | 607,6 |
| 9 | 1675,8 | 317,4 | 696,2 |
| 12 | 2025,0 | 378,2 | 855,6 |
| 14 | | 668,5 | 1293,9 |
| 16 | | 853,5 | 1683,5 |
| 19 | | 1415,5 | 2137,5 |
| 21 | | 1519,2 | |
| 23 | | 1666,0 | |
| 30 | | 2025,0 | |

- 15 **Ejemplo 6e.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en xenoinjertos de tumor gástrico humano.

El objetivo de este estudio fue comparar la actividad antitumoral de **39-S** con la actividad antitumoral del compuesto **C** usando un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano.

- 20 El modelo tumoral usado en este estudio fue HGC27.

La **Tabla 11** informa del crecimiento del volumen tumoral de tumores HGC27 en ratones tratados con placebo, compuesto **C**, y **39S**. Estos resultados también se muestran en la **figura 7**.

Tabla 11

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|-------------|
| | Control | 39-S | Compuesto C |
| 0 | 200,7 | 195,6 | 195,0 |
| 2 | 429,0 | 356,3 | 391,0 |
| 5 | 835,5 | 469,7 | 578,6 |
| 7 | 1256,5 | 467,8 | 708,2 |
| 9 | 1602,2 | 575,2 | 937,7 |
| 12 | 2040,7 | 611,1 | 1169,5 |
| 14 | | 637,3 | 1496,8 |
| 16 | | 690,4 | 1690,6 |
| 19 | | 701,8 | 2004,0 |
| 21 | | 697,4 | 1741,4 |
| 23 | | 715,5 | 2056,4 |
| 26 | | 898,1 | |
| 28 | | 1163,4 | |
| 30 | | 1409,3 | |
| 33 | | 1450,5 | |
| 35 | | 1708,5 | |
| 37 | | 1804,4 | |
| 40 | | 2075,2 | |

Ejemplo 7. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **32** en varios modelos de xenoinjerto.

5 Los compuestos **32** y **ET-736** se proporcionaron en forma de viales liofilizados de producto liofilizado. Cada vial se reconstituyó con agua estéril para inyección hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se realizaron diluciones adicionales con una solución al 5 % de dextrosa para inyección hasta la concentración de la formulación de dosificación. La dosis administrada de **32** y **ET-736** fue de 0,5 mg/Kg.

10 Se proporcionó placebo en forma de producto liofilizado. Cada vial (sacarosa 200 mg + dihidrogenofosfato de potasio 13,6 mg + ácido fosfórico c.s., pH 3,8-4,5) se reconstituyó con agua estéril para inyección (2 ml). Se realizaron diluciones adicionales con una solución al 5 % de dextrosa para inyección.

15 En estos experimentos, **32** y **ET-736**, así como el placebo, se administraron por vía intravenosa en un horario semanal a un volumen de 10 ml/kg.

Ejemplo 7a. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **32** en xenoinjertos de fibrosarcoma humano.

20 El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antitumoral del compuesto **32** mediante la comparación con la actividad antitumoral de **ET-736** usando un modelo de xenoinjerto de sarcoma humano.

El modelo tumoral usado en este estudio fue la línea celular HT-1080.

25 La **Tabla 12** informa de la evaluación del diámetro total (tumor + pata) de tumores HT1080 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 8**.

Tabla 12

| Días | Diámetro total (tumor + pata) (mm) | | |
|------|------------------------------------|------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 7,5 | 7,5 | 7,4 |
| 2 | 9,4 | 8,9 | 8,3 |
| 5 | 11,4 | 8,2 | 7,1 |
| 7 | 12,1 | 8,8 | 7,6 |
| 9 | 13,2 | 10,0 | 7,4 |
| 12 | 14,5 | 8,8 | 7,0 |
| 14 | 15,2 | 10,8 | 7,1 |
| 16 | 15,9 | 11,8 | 7,4 |

(continuación)

| Días | Diámetro total (tumor + pata) (mm) | | |
|------|------------------------------------|------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 19 | 18,0 | 12,0 | 8,4 |
| 21 | | 14,0 | 8,6 |
| 23 | | 13,8 | 10,0 |
| 27 | | 13,6 | 10,9 |
| 30 | | 15,5 | 13,2 |
| 33 | | 18,0 | 14,3 |
| 35 | | | 15,2 |
| 37 | | | 15,8 |
| 40 | | | 16,6 |
| 42 | | | 18,0 |

Ejemplo 7b. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **32** en xenoinjertos de adenocarcinoma de mama humano.

- 5 El objetivo de este estudio fue comparar las actividades antitumorales de **32** y **ET-736** usando un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano.

El modelo tumoral usado en este estudio fue la línea celular MDA-MB-231.

- 10 La **Tabla 13** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores MDA-MB-231 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 9**.

Tabla 13

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 149,4 | 150,2 | 150,0 |
| 2 | 240,0 | 233,6 | 237,7 |
| 5 | 325,1 | 310,6 | 302,1 |
| 7 | 407,8 | 386,1 | 364,9 |
| 9 | 514,8 | 437,5 | 404,6 |
| 12 | 648,1 | 493,4 | 395,4 |
| 14 | 799,0 | 560,3 | 398,3 |
| 16 | 1002,5 | 649,5 | 447,2 |
| 19 | 1233,9 | 853,0 | 485,0 |
| 21 | 1539,1 | 1017,5 | 536,3 |
| 23 | 2006,5 | 1263,2 | 669,8 |
| 26 | 2027,7 | 1487,7 | 778,9 |
| 28 | | 1726,6 | 1046,1 |
| 30 | | 1892,6 | 1315,9 |
| 33 | | 2082,8 | 1664,9 |
| 35 | | | 2007,7 |

- 15 **Ejemplo 7c.** Los estudios *in vivo* para determinar el efecto de **32** en xenoinjertos de cáncer de pulmón humano.

El objetivo de este estudio fue comparar las actividades antitumorales de **32** y **ET-736** usando tres modelos de xenoinjerto diferentes de cáncer de pulmón humano. Estos modelos corresponden a cáncer de pulmón de células no pequeñas (línea celular H-460) y a cáncer de pulmón de células pequeñas (líneas celulares H526 y H82).

- 20 La **Tabla 14** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores H460 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 10**.

Tabla 14

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 187,4 | 183,9 | 185,8 |
| 2 | 577,5 | 455,2 | 457,8 |
| 5 | 1352,0 | 784,8 | 732,8 |
| 7 | 1642,9 | 837,4 | 930,1 |
| 9 | 2025,0 | 1044,3 | 1207,2 |
| 12 | 2025,0 | 1452,4 | 1568,0 |
| 14 | | 1845,5 | 1845,5 |
| 16 | | 2025,0 | 2025,0 |

La **Tabla 15** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores H526 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 11**.

5

Tabla 15

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 217,2 | 212,1 | 213,5 |
| 2 | 410,7 | 277,3 | 240,5 |
| 4 | 778,5 | 127,0 | 97,2 |
| 7 | 1083,2 | 95,0 | 48,8 |
| 9 | 1371,0 | 63,1 | 62,5 |
| 11 | 1782,0 | 62,5 | 62,5 |
| 14 | 2025,0 | 62,5 | 47,3 |
| 16 | | 62,5 | 32,0 |
| 21 | | 4,0 | 4,0 |
| 28 | | 4,0 | 4,0 |
| 35 | | 55,3 | 4,0 |
| 42 | | 85,3 | 4,0 |
| 49 | | 185,6 | 4,0 |
| 56 | | 169,1 | 4,0 |
| 63 | | 62,5 | 4,0 |
| 70 | | 88,9 | 4,0 |
| 77 | | 280,6 | 4,0 |
| 84 | | 694,2 | 199,8 |
| 91 | | 1150,9 | 786,5 |

La **Tabla 16** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores H82 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 12**.

10

Tabla 16

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 171,6 | 171,6 | 170,0 |
| 2 | 439,4 | 309,4 | 334,4 |
| 5 | 1024,7 | 485,0 | 539,4 |
| 7 | 1422,0 | 708,4 | 836,4 |
| 9 | 1923,8 | 972,6 | 1013,1 |
| 12 | 2025,0 | 1101,6 | 1290,9 |
| 14 | | 1339,6 | 1648,0 |
| 16 | | 1430,3 | |
| 19 | | 1885,7 | |

Ejemplo 7d. Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **32** en xenoinjertos de tumor de ovario humano.

5 El objetivo de este estudio fue comparar las actividades antitumorales de **32** y **ET-736** usando un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario humano.

El modelo tumoral usado en este estudio fue A2780.

10 La **Tabla 17** informa de la evaluación del volumen de tumores A2780 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 13**.

Tabla 17

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 169,5 | 168,6 | 168,8 |
| 2 | 317,5 | 262,9 | 251,2 |
| 5 | 758,9 | 572,7 | 382,6 |
| 7 | 1351,9 | 997,5 | 676,1 |
| 9 | 1675,8 | 1359,9 | 959,4 |
| 12 | 2025,0 | 1715,0 | 1241,5 |
| 14 | | 2025,0 | 1582,7 |
| 16 | | 2025,0 | 1646,4 |
| 19 | | | 1845,5 |
| 21 | | | 2025,0 |

15 **Ejemplo 7e.** Estudios *in vivo* para determinar el efecto de **32** en xenoinjertos de tumor gástrico humano.

El objetivo de este estudio fue comparar las actividades antitumorales de **32** y **ET-736** usando un modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano.

El modelo tumoral usado en este estudio fue HGC27.

20 La **Tabla 18** informa del crecimiento del volumen tumoral de tumores HGC27 en ratones tratados con placebo, **ET-736** y **32**. Estos resultados también se muestran en la **figura 14**.

Tabla 18

| Días | Volumen tumoral medio (mm ³) | | |
|------|--|--------|--------|
| | Control | 32 | ET-736 |
| 0 | 200,7 | 194,8 | 195,9 |
| 2 | 429,0 | 386,3 | 359,2 |
| 5 | 835,5 | 551,3 | 537,6 |
| 7 | 1256,5 | 579,2 | 553,5 |
| 9 | 1602,2 | 665,8 | 604,7 |
| 12 | 2040,7 | 701,1 | 627,4 |
| 14 | | 814,5 | 648,0 |
| 16 | | 959,9 | 687,6 |
| 19 | | 1312,4 | 760,0 |
| 21 | | 1626,8 | 792,4 |
| 23 | | 1737,3 | 818,9 |
| 26 | | | 1026,1 |
| 28 | | | 1354,9 |

25 **Ejemplo 8** (para referencia). Los estudios *in vivo* para determinar el efecto de **39-S** en xenoinjertos de próstata humana. El objetivo de este estudio fue comparar la actividad antitumoral de **39-S** usando tres modelos de xenoinjerto diferentes de cáncer de próstata humana. Estos modelos corresponden a las líneas celulares PC-3, DU-145 y 22Rv1.

30 El **Compuesto 39-S** se proporcionó en forma de viales liofilizados de producto liofilizado. Cada vial se reconstituyó

5 con agua estéril para inyección hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se realizaron diluciones adicionales con una solución al 5 % de dextrosa para inyección hasta la concentración de la formulación de dosificación. La dosis administrada de **39-S** varió dependiendo del estudio, que es de 1,25 mg/kg cuando el modelo de tumor fue PC-3, 1,00 mg/kg cuando el modelo de tumor fue DU-145 y de 0,75 mg/kg cuando el modelo de tumor fue 22Rv1, respectivamente.

Se proporcionó placebo en forma de torta liofilizada que contenía 100 mg de sacarosa + 6,8 mg de dihidrogenofosfato de potasio + ácido fosfórico, c.s, a pH 3,8-4,5, que se reconstituyó con agua para infusión.

10 En estos experimentos, **39-S**, así como el placebo, se administraron por vía intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas consecutivas, los Días 0, 7 y 14, siempre que fue posible.

La **Tabla 19** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores PC-3 en ratones tratados con placebo y **39-S**. Estos resultados se muestran también en la figura 15.

15

Tabla 19

| Volumen tumoral medio (mm³) | | |
|---|----------------|-------------|
| Días | Control | 39-S |
| 0 | 181,9 | 182,3 |
| 2 | 254,8 | 222,6 |
| 4 | 308,7 | 244,0 |
| 7 | 344,5 | 269,3 |
| 9 | 396,8 | 295,8 |
| 11 | 439,2 | 315,0 |
| 14 | 542,7 | 356,9 |
| 16 | 619,0 | 388,0 |
| 18 | 721,3 | 400,1 |
| 21 | 908,1 | 503,3 |
| 23 | 1039,1 | 556,0 |
| 25 | 1117,0 | 579,6 |
| 28 | 1232,3 | 694,9 |
| 30 | 1778,6 | 811,1 |
| 32 | 2018,1 | 1027,1 |
| 35 | | 1194,3 |
| 37 | | 1495,0 |
| 39 | | 1710,7 |
| 42 | | 2066,2 |

La **Tabla 20** informa la evaluación del volumen tumoral medio de los tumores DU-145 en ratones tratados con placebo y **39 S**. Estos resultados se muestran también en la figura 16.

20

Tabla 20

| Volumen tumoral medio (mm³) | | |
|---|----------------|-------------|
| Días | Control | 39-S |
| 0 | 156,8 | 179,9 |
| 2 | 198,3 | 199,9 |
| 4 | 253,9 | 222,2 |
| 7 | 325,8 | 340,5 |
| 9 | 385,1 | 354,1 |
| 11 | 462,2 | 349,7 |
| 14 | 483,8 | 429,1 |
| 16 | 599,0 | 454,8 |
| 18 | 664,0 | 449,7 |
| 21 | 816,9 | 517,5 |
| 23 | 861,3 | 568,5 |

(continuación)

| Volumen tumoral medio (mm³) | | |
|---|----------------|-------------|
| Días | Control | 39-S |
| 25 | 977,9 | 629,4 |
| 28 | 973,6 | 775,7 |

La **Tabla 21** informa de la evaluación del volumen tumoral medio de tumores 22Rv1 en ratones tratados con placebo y **39S**. Estos resultados se muestran también en la figura 17.

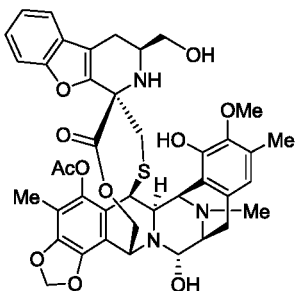
5

Tabla 21

| Volumen tumoral medio (mm³) | | |
|---|----------------|-------------|
| Días | Control | 39-S |
| 0 | 174,6 | 173,5 |
| 3 | 307,2 | 93,0 |
| 5 | 511,5 | 96,8 |
| 7 | 739,1 | 115,2 |
| 10 | 955,2 | 108,2 |
| 12 | 1286,1 | 128,4 |
| 14 | 1385,8 | 155,6 |
| 17 | 1791,1 | 173,4 |
| 19 | 2025,0 | 210,2 |
| 24 | | 358,8 |
| 26 | | 456,5 |
| 28 | | 645,2 |
| 31 | | 1049,5 |
| 33 | | 1439,4 |
| 35 | | 2025,0 |

REIVINDICACIONES

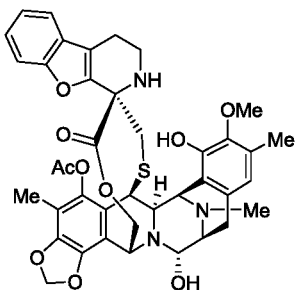
1. Un compuesto de fórmula **V**, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo:



5

V.

2. Un compuesto de fórmula **VI**, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo:



10

VI.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la sal se selecciona de clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato, *p*-toluenosulfonato; sodio, potasio, calcio, sales de amonio; y etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilenetanolamina, trietanolamina y sales de aminoácidos básicas.

15

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

5. Una forma de dosificación que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo, una composición de acuerdo con la reivindicación 4, o una forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso como un medicamento.

25

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo, una composición de acuerdo con la reivindicación 4, o una forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento del cáncer.

30

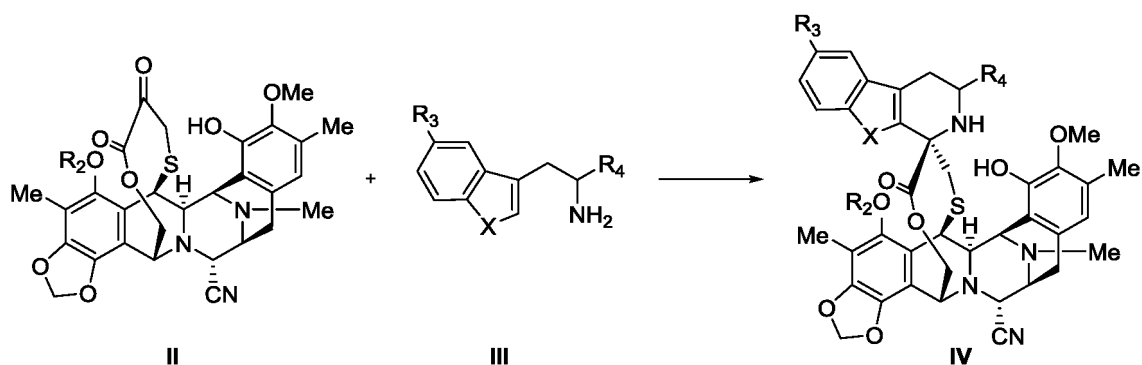
8. El compuesto, la composición o la forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de páncreas, sarcoma, cáncer de ovario y cáncer gástrico.

35

9. El compuesto, la composición o la forma de dosificación de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal.

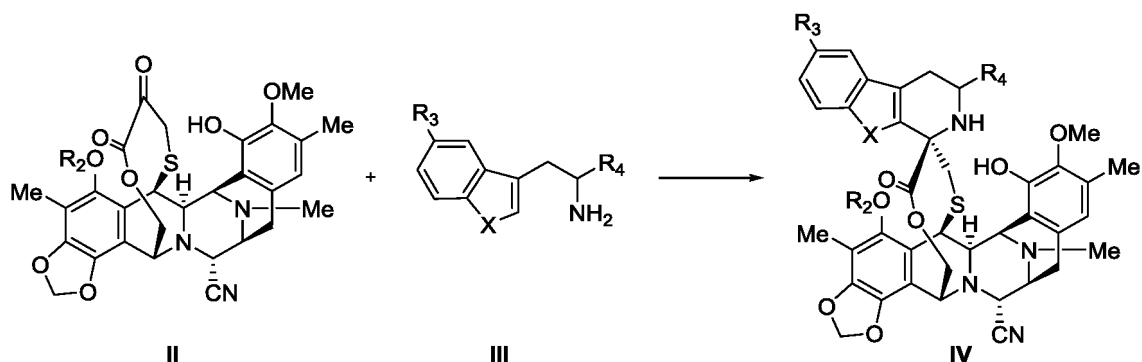
40

10. Un proceso para obtener un compuesto de Fórmula **V** como se define en la reivindicación 1 o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo: que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula **II** con un compuesto de fórmula **III** para dar un compuesto de fórmula **IV**:



en las que:

- 5 X es -O-;
R₂ es acetilo;
R₃ es hidrógeno;
R₄ es -CH₂OH.
- 10 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende la etapa adicional de reemplazar el grupo ciano en el compuesto de fórmula IV con un grupo hidroxilo para dar un compuesto de fórmula V.
12. Un proceso para obtener un compuesto de Fórmula VI como se define en la reivindicación 2 o una sal o un éster farmacéuticamente aceptables del mismo:
- 15 que comprende la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III para dar un compuesto de fórmula IV:



20 en la que:

- X es -O-;
R₂ es acetilo;
R₃ es hidrógeno;
R₄ es hidrógeno.
- 25
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende la etapa adicional de reemplazar el grupo ciano en el compuesto de fórmula IV con un grupo hidroxilo para dar un compuesto de fórmula VI.
- 30 14. Un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende además instrucciones de uso del compuesto en el tratamiento del cáncer, y más preferiblemente un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de páncreas, sarcoma, cáncer de ovario y cáncer gástrico.
- 35

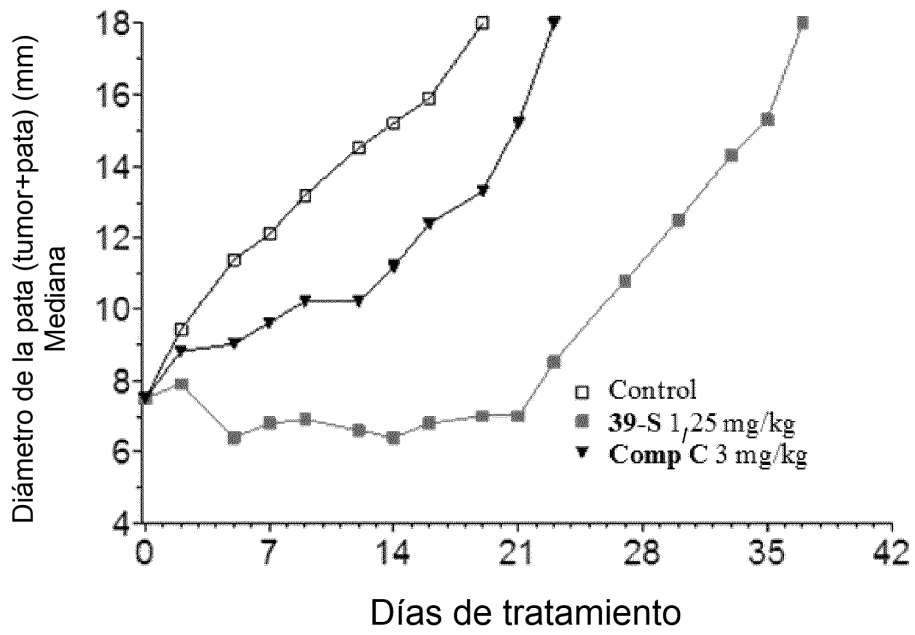


Figura 1

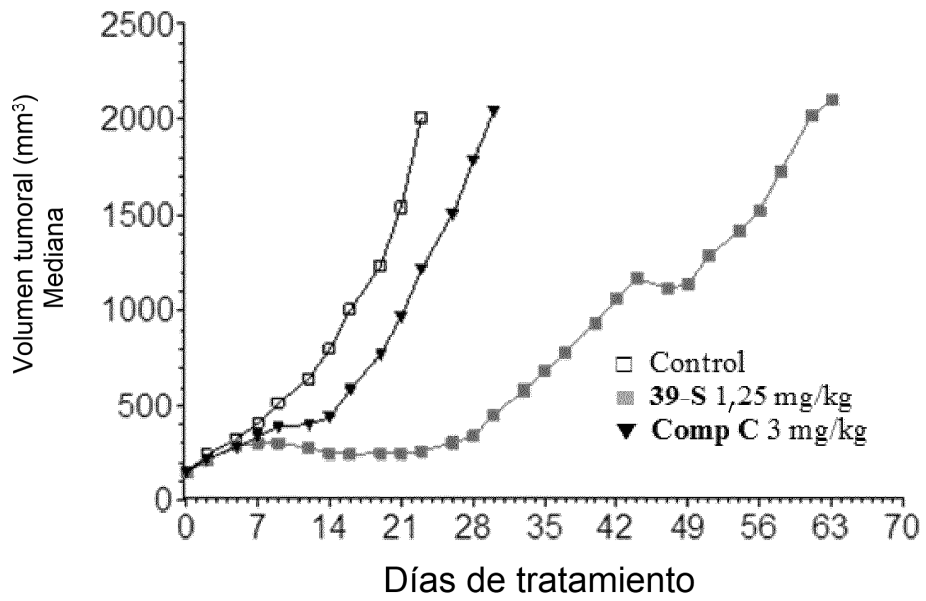


Figura 2

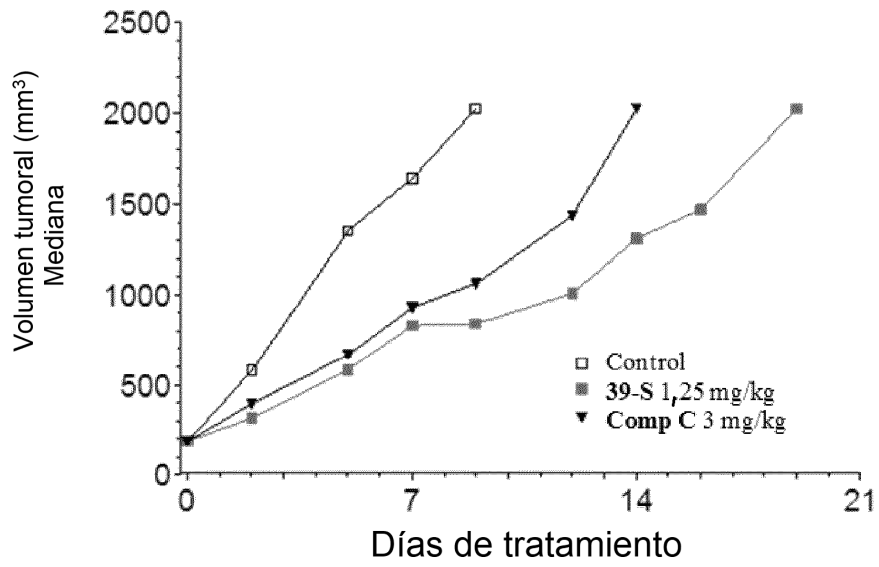


Figura 3

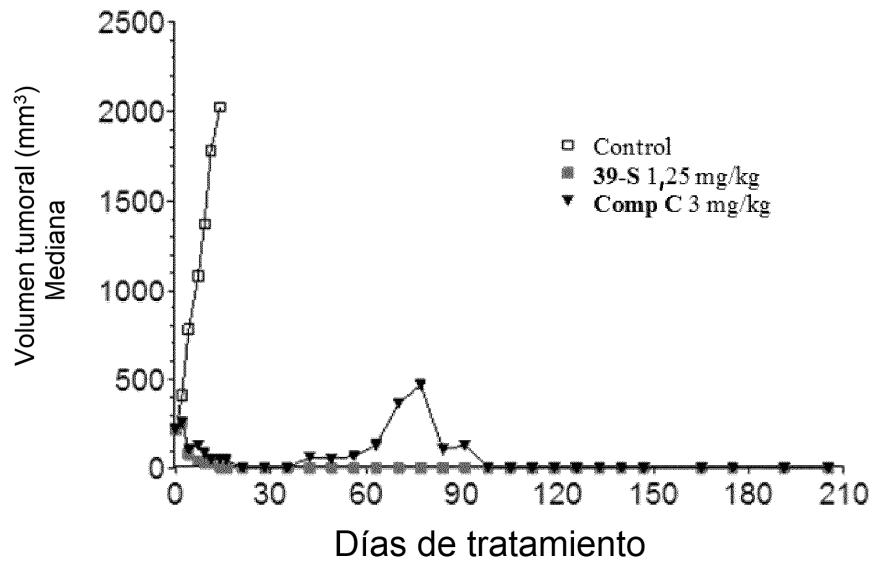


Figura 4

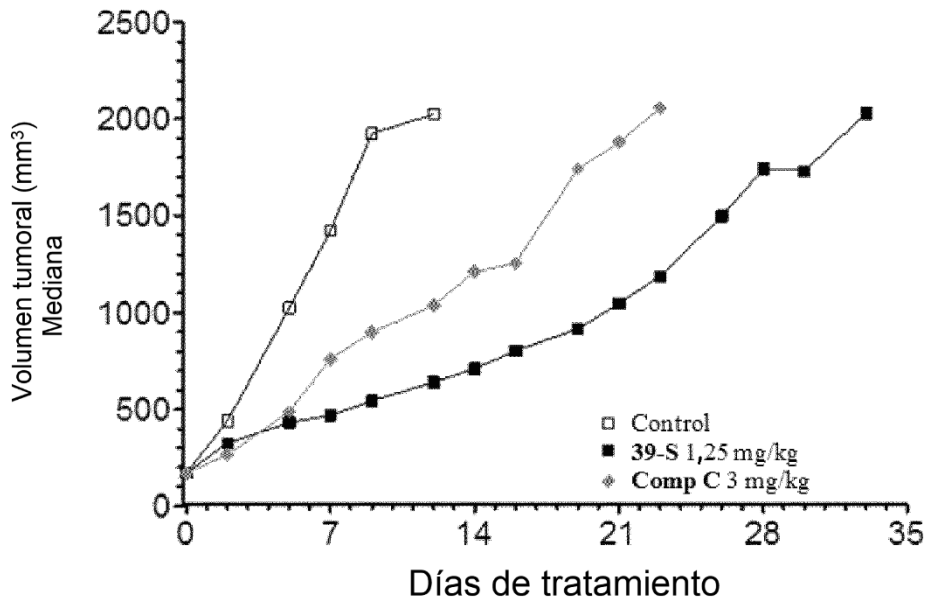


Figura 5

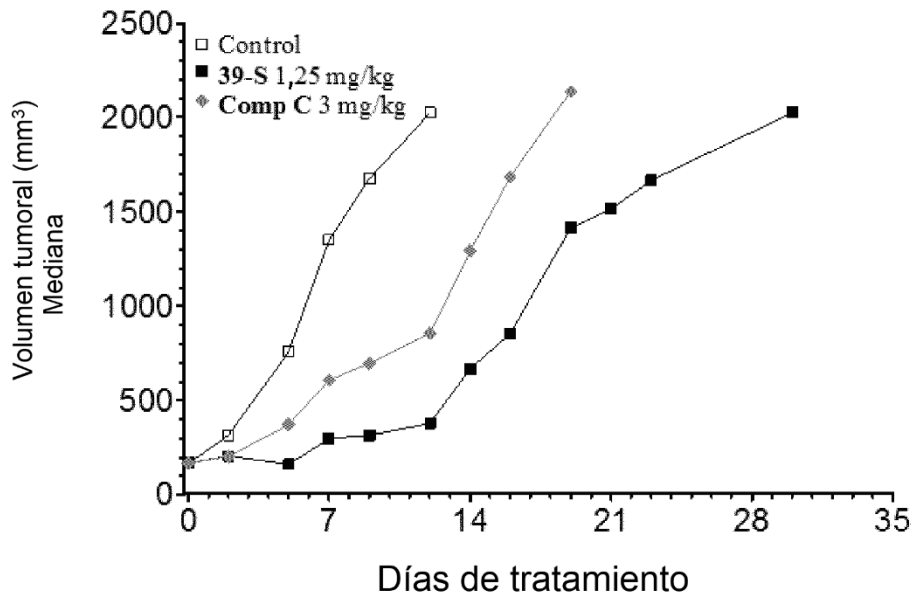


Figura 6

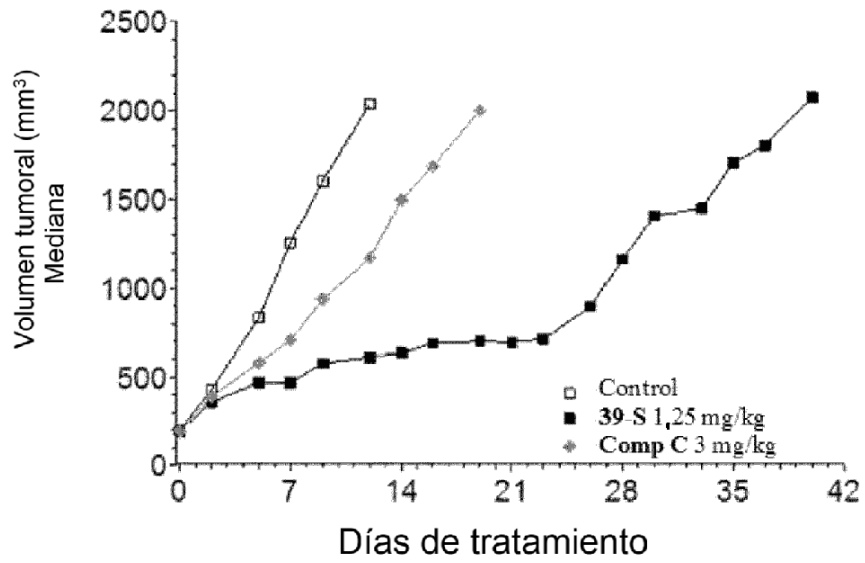


Figura 7

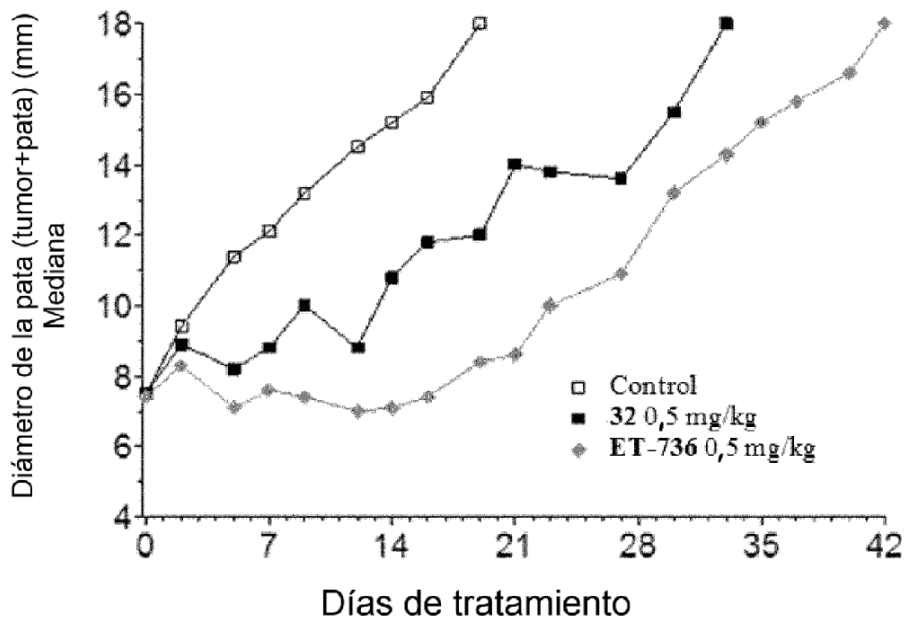


Figura 8

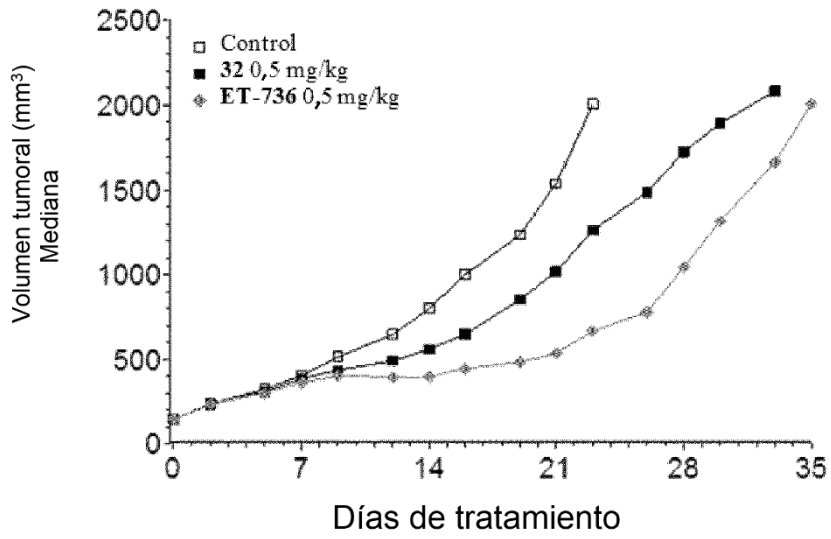


Figura 9

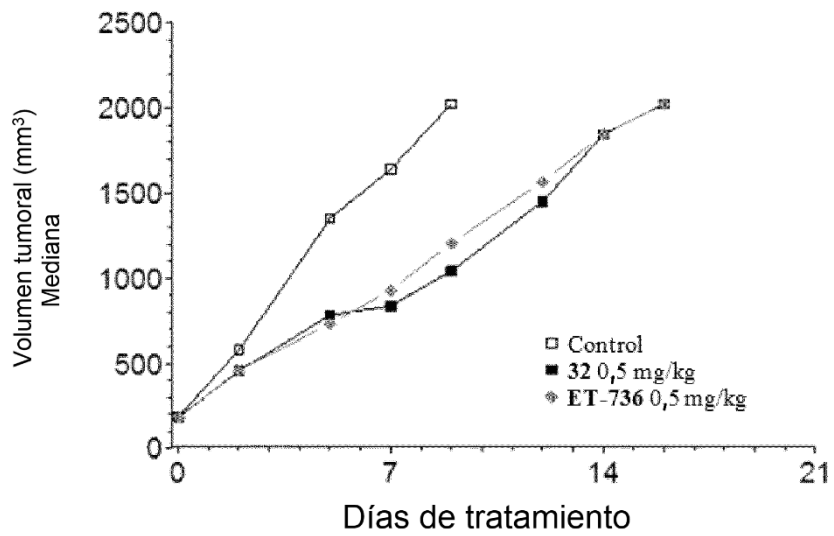


Figura 10

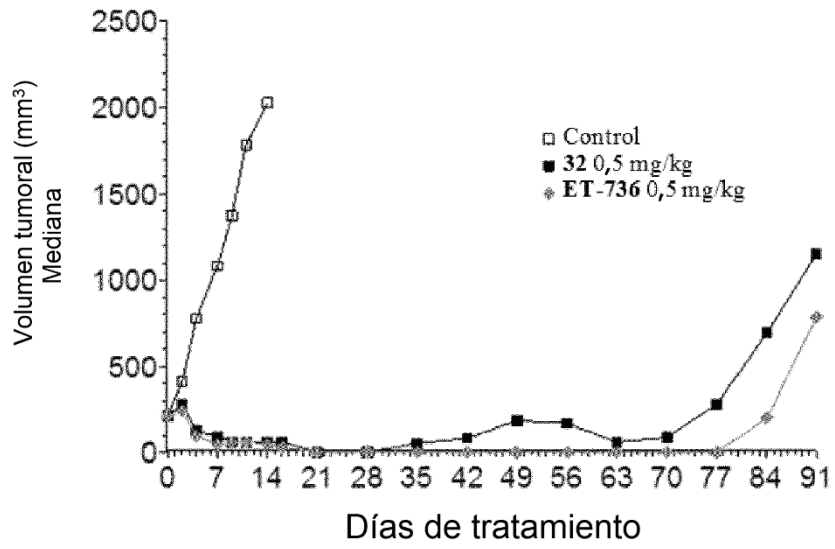


Figura 11

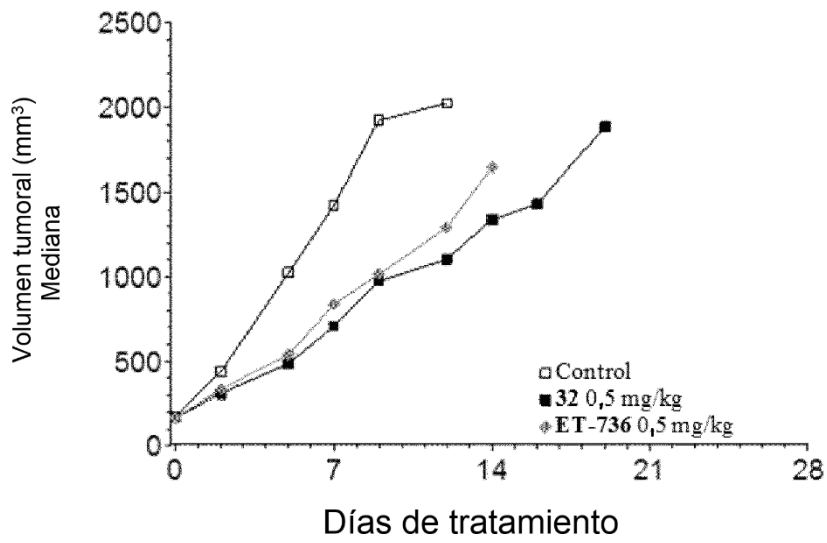


Figura 12

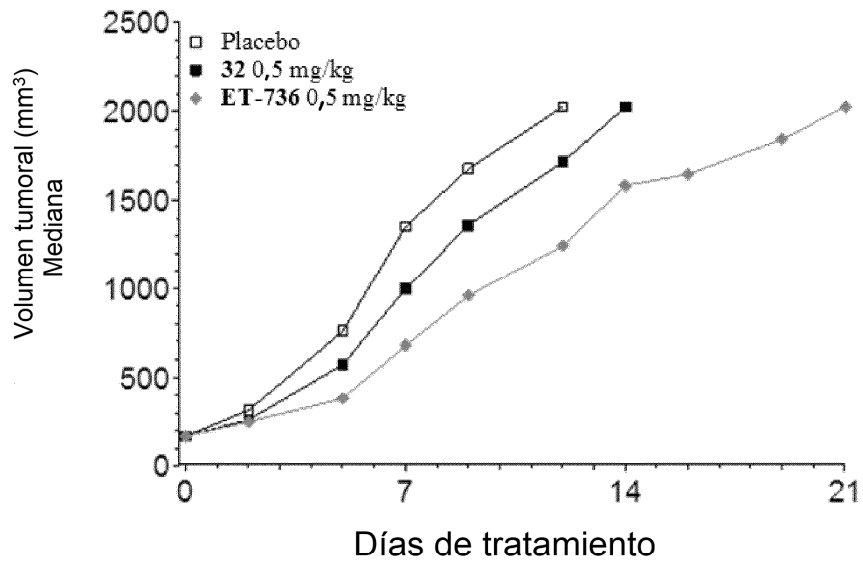


Figura 13

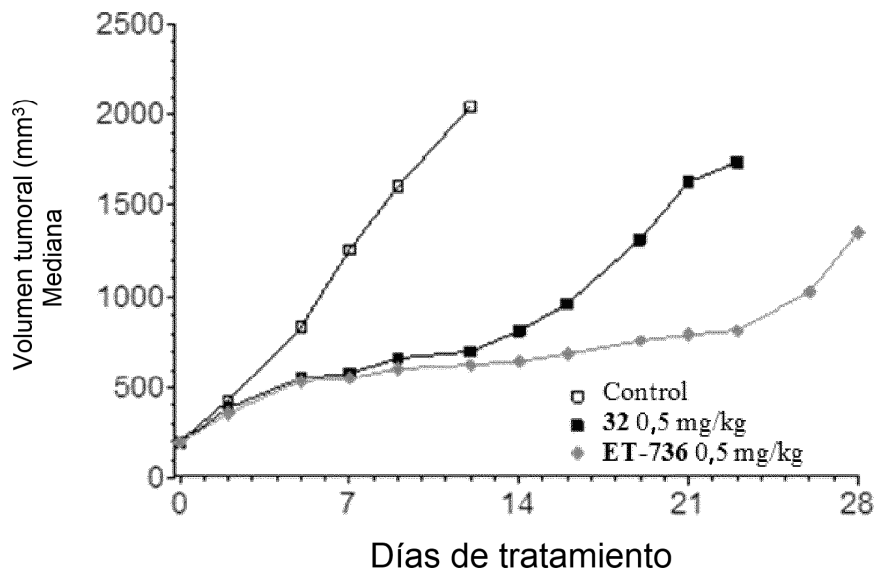


Figura 14

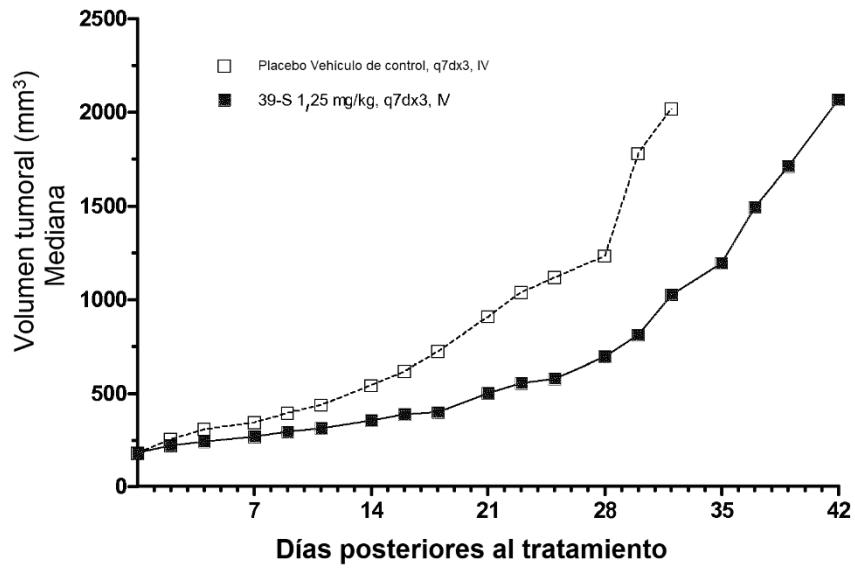


Figura 15

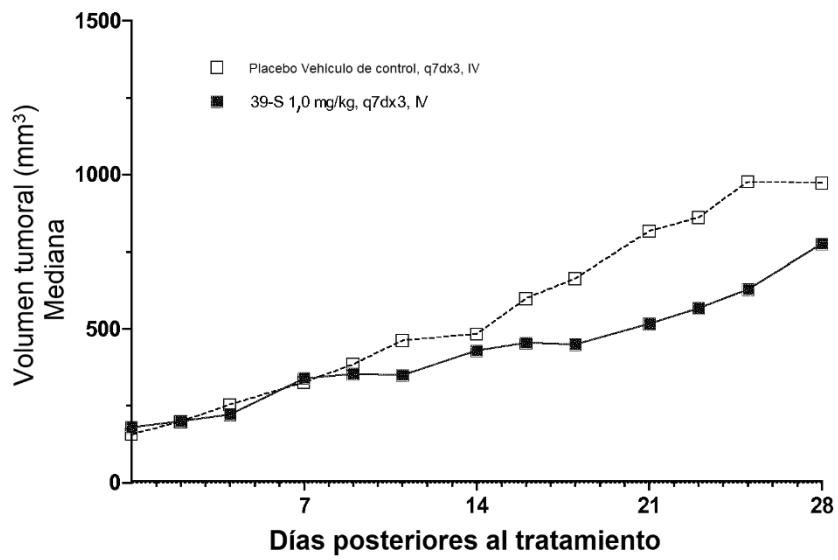


Figura 16

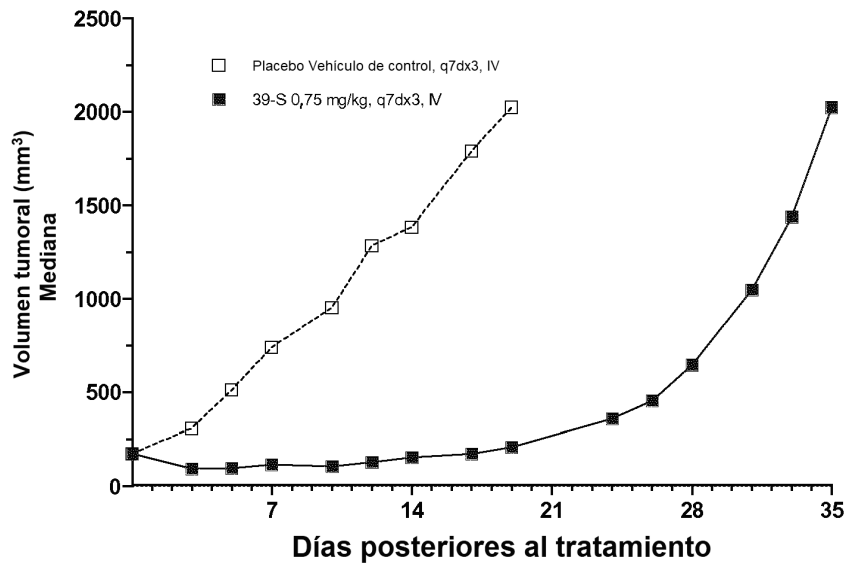


Figura 17