

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 600**

51 Int. Cl.:

A61K 31/357 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2019 PCT/EP2019/058881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2019 WO19197367**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2019 E 19715924 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3773549**

54 Título: **Combinación de quinolin-4-carboxamidas y derivados de benzonaftiridina como combinación de fármacos antipalúdicos**

30 Prioridad:

11.04.2018 EP 18166769

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

27.01.2025

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.00%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**SPANGENBERG, THOMAS;
OEUVRAY, CLAUDE y
ABLA, NADA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 994 600 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

Combinación de quinolin-4-carboxamidas y derivados de benzonaftridina como combinación de fármacos antipalúdicos

5 La presente invención se refiere a una combinación que comprende como primer principio activo (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y como segundo principio activo pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La presente invención también se refiere a una combinación de tres principios activos antipalúdicos, en concreto de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal de la misma, pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y artemisinina o derivados de la misma. La invención además se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden esta combinación y al uso de la misma en el tratamiento y/o prevención del paludismo.

Antecedentes de la invención

15 Impulsada por un fenómeno evolutivo, la resistencia a los medicamentos antipalúdicos supone un desafío constante para el desarrollo de fármacos y ha llevado a la desaparición sucesiva de tratamientos de primera línea como cloroquina, proguanil, pirimetamina, sulfadoxina-pirimetamina y mefloquina, que son incapaces de producir una respuesta clínica del 90 % en muchas zonas donde se han aplicado intensamente (Mita T, Tanabe K, Kita K: Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Parasitol Int.* 2009, 58: 201-209; World Health Organization: Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. 2010, WHO, Geneva, 20 121). Desde entonces se han implementado tratamientos a base de artemisinina (ACT) que se han convertido en el tratamiento de referencia con la aprobación del tratamiento con arteméter-lumefantrina. Todos los ACT se administran a diario durante 3 días y ya se han observado problemas de cumplimiento por parte de los pacientes en cada región. El motivo que subyace al desarrollo de los tratamientos de combinación a base de artemisinina era combinar un compuesto de acción muy rápida (un derivado de artemisinina) que matará a más del 80 % de los parásitos durante las primeras 24 horas (reduciendo rápidamente los síntomas) con un compuesto de acción prolongada como 4-aminoquinolina, que proporcionará cierta protección frente a la reinfección (profilaxis postratamiento). En la actualidad, la aparición de resistencia a la artemisinina en el sudeste asiático ha sido relativamente lenta. Hasta el momento, esto se traduce en una disminución del tiempo de eliminación de los parásitos, como se notificó, por ejemplo, en Tailandia (Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, Ler Moo C, Al-Saai S, Dondorp AM, Lwin KM, Singhasivanon P, Day NPJ, White NJ, Anderson TJC, Nosten F: Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *Lancet.* 2012, 379: 1960-1966).

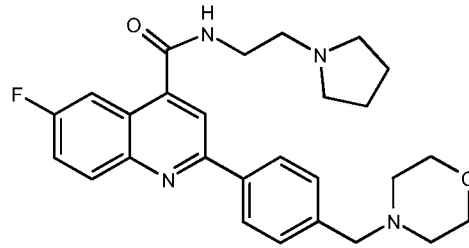
35 Según la recomendación de la OMS, es necesario desarrollar nuevos fármacos antipalúdicos como combinación de dosis fija. El objetivo del tratamiento de combinación de fármacos para enfermedades parasitarias como el paludismo es prevenir el desarrollo de resistencia, al tiempo que proporciona beneficios adicionales para el tratamiento proporcionando una tasa de curación más alta. El motivo es que cualquier organismo resistente a un componente de la combinación debería ser eliminado por el otro, siempre que ambos tengan modos de acción distintos. Por lo tanto, se eleva la barrera para la resistencia, ya que el parásito tendría que adquirir ambas resistencias simultáneamente, un escenario bastante improbable suponiendo que los eventos de mutación se comportan de manera estocástica (White N, Olliaro PL: Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: Rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitol Today.* 1996, 12: 399-401). Deben tenerse en cuenta otros factores importantes que influyen en la aparición de resistencia a los medicamentos, por ejemplo, los efectos del medicamento en otras etapas del ciclo de vida del parásito, como la gametocitogénesis y la viabilidad de los gametocitos, la semivida del medicamento, la ratio de reducción clínica del parásito o la dosis del medicamento (Xavier C Ding, David Ubben and Timothy NC Wells, A framework for assessing the risk of resistance for anti-malarials in development, *Malaria Journal* 2012, 11:292).

50 Durante la última década, las campañas de detección fenotípica de alto rendimiento han permitido el descubrimiento de nuevas clases de medicamentos antipalúdicos, aumentando así el número de posibles nuevas terapias combinadas para el tratamiento del paludismo y fortaleciendo la necesidad de un proceso racional de selección y priorización de las más prometedoras, incluido, entre otros, el efecto antiparasitario beneficioso de las dos entidades químicas y la evaluación temprana del riesgo de desarrollar resistencia asociada con cada compuesto y cada combinación (Canfield C.J., Pudney M., Gutteridge W.E. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Exp Parasitol.* 1995, 80:373-81; Fivelman, Q.L., Adagu I.S., Warhurst, D.C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004, 48:4097-4102).

Descripción de la invención

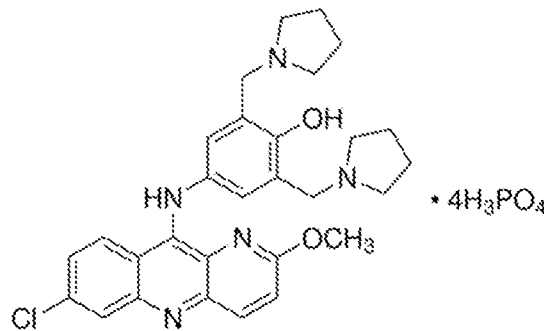
En la presente invención se proporciona una combinación que comprende como primer principio activo (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéu-
 5 ticamente aceptable de la misma y como segundo principio activo pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, preferiblemente para su uso en el tratamiento y/o la prevención del paludismo.

En estas combinaciones la (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico puede estar en forma de la base libre (como se muestra a continuación), así como también en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (como, en particular, una sal succinato):



(2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (base libre)

Adicionalmente, en estas combinaciones la pironaridina puede estar en forma de base libre y en forma de una sal farmacéuticamente aceptable como, en particular, tetrafosfato de pironaridina que se muestra a continuación:

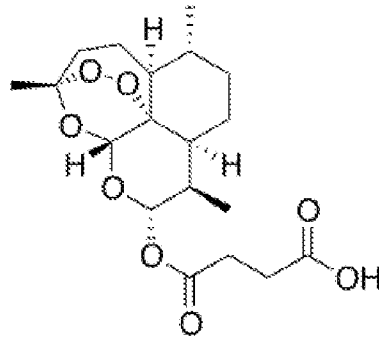


tetrafosfato de pironaridina

La combinación descrita anteriormente según la invención muestra propiedades parasitológicas aditivas, y además de esto, se encontró sorprendentemente que las gp-P expulsan (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (y cualquiera de sus sales) y que la pironaridina, que es
 20 (a diferencia de muchos otros fármacos antipalúdicos) un inhibidor de la gp-P (Qi J, Yang CZ, Wang CY, Wang SB, Yang M, Wang JH. Function and mechanism of pyronaridine: a new inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Acta Pharmacol Sin. 2002, 23:544-50), puede afectar positivamente al paso de la (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (y cualquiera de sus sales) a través de la pared intestinal a dosis más bajas, lo cual afecta positivamente a la ventana terapéutica.

La presente invención también se refiere a una combinación que además comprende artemisinina y un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma como tercer principio activo, donde el derivado de artemisinina se selecciona a partir de un grupo compuesto por: dihidroartemisina, arteméter y artesunato.

A los fines de esta invención, el término «artesunato» se utiliza para el ácido artesúnic:



Ácido artesúnic

En una realización específica de la presente invención, el tercer principio activo es artesunato o una sal farmacéuticamente aceptable de artesunato (preferiblemente artesunato de sodio o una sal alcalina metálica de carbonato como, por ejemplo, carbonato de sodio o carbonato de potasio).

Sales farmacéuticas y otras formas

Los compuestos mencionados anteriormente incluidos en las combinaciones pueden usarse en sus formas finales no salinas. Por otro lado, la presente invención también se refiere al uso de estos compuestos en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, que pueden derivar de diversos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Las formas de sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluidos en las combinaciones se preparan, en su mayor parte, mediante métodos convencionales. Si un compuesto incluido en las combinaciones contiene un centro ácido (como por ejemplo un ácido artesúnic) como grupo carboxilo, se puede formar una de sus sales adecuadas haciendo reaccionar el compuesto con una base adecuada para obtener la correspondiente sal de adición de base. Dichas bases son, por ejemplo, hidróxidos de metales alcalinos, como hidróxido de potasio e hidróxido de sodio; hidróxidos de metales alcalinotérreos, como hidróxido de magnesio e hidróxido de calcio; carbonatos de metales alcalinos (como carbonato de sodio y carbonato de potasio) y diversas bases orgánicas como piperidina, dietanolamina y N-metil-glucamina (meglumina), benzetina, colina, dietanolamina, etilendiamina, benetamina, dietilamina, piperazina, lisina, L-arginina, amoniaco, trietanolamina, betaina, etanolamina, morfolina y trometamina.

En el caso de que un compuesto incluido en las combinaciones contenga un centro básico (como por ejemplo, (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico y pironaridina), pueden formarse sales de adición de ácido tratando estos compuestos con ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, haluros de hidrógeno, como cloruro de hidrógeno o bromuro de hidrógeno, otros ácidos minerales y sus correspondientes sales.

En una realización específica de la presente invención la sal farmacéuticamente activa de pironaridina, que puede utilizarse en la combinación, la composición farmacéutica (como se describe a continuación) y/o el método para el tratamiento y/o la prevención del paludismo (como se describe a continuación), es una sal que se selecciona entre el grupo compuesto por: sales de acetato, sales de benzoato, sales de besilato, sales de bromuro, sales de camsilato, sales de carbonato, sales de citrato, sales de cloruro, sales de edisilato, sales de estolato, sales de fumarato, sales de gluceptato, sales de gluconato, sales de glucuronato, sales de hipurato, sales de yoduro, sales de isotionato, sales de lactato, sales de lactobionato, sales de malato, sales de maleato, sales de mesilato, sales de metilsulfato, sales de napsilato, sales de nitrato, sales de oxalato, sales de pamoato, sales de fosfato (como, en particular, sales de tetrafosfato), sales de estearato, sales de succinato, sales de sulfato, sales de tartrato y sales de tosilato; preferiblemente, la sal farmacéuticamente activa de pironaridina es una sal seleccionada a partir de un grupo compuesto por: sales de acetato, sales de benzoato, sales de besilato, sales de citrato, sales de cloruro, sales de edisilato, sales de fumarato, sales de lactato (como, en particular, sales de L-lactato), sales de malato (como, en particular, sales de L-malato), sales de maleato, sales de mesilato, sales de napsilato, sales de oxalato, sales de fosfato (incluidas en particular, sales de tetrafosfato), sales de succinato, sales de sulfato, sales de tartrato (como en particular, sales de L-tartrato) y sales de tosilato, e incluso más preferiblemente la sal farmacéuticamente activa de pironaridina es una sal seleccionada entre el grupo compuesto por: sales de cloruro, sales de fumarato, sales de maleato, sales de mesilato, sales de fosfato (como en particular, sales de tetrafosfato), sales de sulfato y sales de tosilato.

En otra realización específica de la presente invención la sal farmacéuticamente activa de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico, que puede utilizarse en la combinación, la composición farmacéutica (como se describe a continuación) y/o el método para el tratamiento y/o la prevención del paludismo (como se describe a continuación), es una sal que se selecciona entre el grupo

compuesto por: sales de acetato, sales de benzoato, sales de besilato, sales de bromuro, sales de camsilato, sales de carbonato, sales de citrato, sales de cloruro, sales de edisilato, sales de estolato, sales de fumarato, sales de gluceptato, sales de gluconato, sales de glucuronato, sales de hipurato, sales de yoduro, sales de isotionato, sales de lactato, sales de lactobionato, sales de malato, sales de maleato, sales de mesilato, sales de metilsulfato, sales de napsilato, sales de nitrato, sales de oxalato, sales de pamoato, sales de fosfato (como, en particular, sales de tetrafosfato), sales de estearato, sales de succinato, sales de sulfato, sales de tartrato y sales de tosilato; preferiblemente, la sal farmacéuticamente activa de pironaridina es una sal seleccionada a partir de un grupo compuesto por: sales de acetato, sales de benzoato, sales de besilato, sales de citrato, sales de cloruro, sales de edisilato, sales de fumarato, sales de lactato (como, en particular, sales de L-lactato), sales de malato (como, en particular, sales de L-malato), sales de maleato, sales de mesilato, sales de napsilato, sales de oxalato, sales de fosfato, sales de succinato, sales de sulfato, sales de tartrato (como en particular, sales de L-tartrato) y sales de tosilato, e incluso más preferiblemente la sal farmacéuticamente activa de pironaridina es una sal seleccionada entre el grupo compuesto por: sales de cloruro, sales de fumarato, sales de maleato, sales de mesilato, sales de fosfato, sales de sulfato y sales de tosilato.

En otra realización específica de la presente invención la sal farmacéuticamente activa de artesunato, que puede utilizarse en la combinación, la composición farmacéutica (como se describe a continuación) y/o el método para el tratamiento y/o prevención del paludismo (como se describe a continuación), es una sal seleccionada entre un grupo compuesto por: sales de sodio y sales de potasio.

Una realización en particular de la presente invención se refiere a una combinación que comprende a) (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (base libre) o succinato de la (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico y b) tetrafosfato de pironaridina o pironaridina (base libre). En una realización incluso más específica la combinación comprende a) (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (base libre) o succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico y b) tetrafosfato de pironaridina.

En otra realización la combinación comprende a) (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (base libre) o succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico, b) pironaridina (base libre) o tetrafosfato de pironaridina y c) artesunato o artesunato de sodio.

En una realización muy específica la combinación comprende a) (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (base libre) o succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico, b) tetrafosfato de pironaridina y c) artesunato de sodio.

Los principios activos de las combinaciones según la invención se administran de forma simultánea o secuencial (distribuido a lo largo del tiempo).

En caso de que la administración de los principios activos se lleve a cabo de forma simultánea, los dos o tres principios activos pueden combinarse en una única forma farmacéutica (combinación fija, como por ejemplo, un comprimido o un sobre). Independientemente de si la administración de los principios activos se hace de forma simultánea o no o, en caso de tres ingredientes activos, parcialmente simultánea, los dos o tres principios activos pueden estar en distintas formas farmacéuticas. En este caso, las combinaciones según la invención pueden estar en forma de un kit.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la combinación descrita en este documento como medicamentos. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de las combinaciones descritas en este documento en el tratamiento y/o prevención del paludismo. La presente invención también abarca el uso de una combinación descrita en este documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del paludismo.

45 Composiciones farmacéuticas

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del paludismo, que comprende como primer principio activo (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y como segundo principio activo pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, ambos principios activos preferiblemente en dosis terapéuticamente activas.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del paludismo, que comprende como primer principio activo (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como segundo principio activo pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y como tercer

principio activo artesunato o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma como, por ejemplo, artesunato de sodio).

5 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principios activos dosis terapéuticamente activas de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y también al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento y/o la prevención del paludismo. Además se describe una realización específica de una composición farmacéutica que comprende como principio activo adicional una dosis terapéuticamente activa de artemisinina o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en forma de unidades de dosis, que comprenden una cantidad predeterminada de principio activo por unidad de dosis. Dicha unidad puede comprender diferentes dosis de una combinación según la invención, dependiendo de la enfermedad tratada, el método de administración y la edad, peso y estado del paciente, o las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de unidades de dosis que comprendan una cantidad predeterminada de principio activo por unidad de dosis. Las formulaciones de unidad de dosis preferidas son aquellas que comprenden una dosis, o parte de la dosis, diaria como se indica anteriormente, o una fracción correspondiente de la misma de un principio activo. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de este tipo pueden prepararse usando un proceso, que es generalmente conocido en la técnica farmacéutica.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden adaptarse para su administración mediante cualquier método adecuado deseado, por ejemplo, mediante métodos orales (incluyendo bucal o sublingual), rectales, nasales, tópicos (incluyendo bucal, sublingual o transdérmico) o parenterales (incluyendo subcutáneo, intramuscular, intravenoso o intradérmico). Estas composiciones pueden prepararse usando todos los procesos conocidos en la técnica farmacéutica mediante, por ejemplo, combinación del principio activo con excipientes o adyuvantes.

25 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden administrarse como unidades independientes como, por ejemplo, cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas comestibles o alimentos en forma de espuma; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite. Por tanto, por ejemplo, en el caso de administración oral en forma de comprimido o cápsula, el principio activo puede combinarse con un excipiente inerte, oral, no tóxico y farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo, etanol, glicerol, agua y similar. Los polvos se preparan triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un excipiente farmacéutico triturado de forma similar, como por ejemplo, un hidrato de carbono comestible, como por ejemplo, almidón o manitol. También pueden estar presentes un agente aromatizante, un conservante, un dispersante y un colorante.

35 Las cápsulas se producen preparando una mezcla en polvo como se describe anteriormente y rellenando el envoltorio de gelatina conformado con la mezcla. Antes de la operación de llenado pueden añadirse a la mezcla en polvo agentes deslizantes y lubricantes, como por ejemplo, ácido silícico altamente disperso, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol en forma sólida. Asimismo, puede añadirse un desintegrante o solubilizante, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento después de que se haya tomado la cápsula. Además, si se desea o es necesario, pueden incorporarse también a la mezcla agentes aglutinantes, lubricantes y desintegrantes, así como colorantes adecuados. Entre los aglutinantes idóneos se incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, como por ejemplo, glucosa o beta-lactosa, edulcorantes a base de maíz, caucho natural y sintético, como por ejemplo, de acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Entre los agentes lubricantes utilizados en estas formas farmacéuticas se incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Entre los agentes desintegrantes se incluyen, sin restricciones, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla en polvo, granulando o prensando en seco la mezcla, añadiendo un lubricante y un desintegrante y prensando la mezcla completa para obtener los comprimidos. Se prepara una mezcla en polvo mezclando el compuesto triturado de forma adecuada con un diluyente o una base, como se describe anteriormente, y opcionalmente con un aglutinante, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina o polivinilpirrolidona, un retardante de disolución, como por ejemplo, parafina, un acelerador de la absorción, como por ejemplo, una sal cuaternaria, y/o un absorbente, como por ejemplo, bentonita, caolina o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo puede granularse humedeciéndola con un aglutinante, como por ejemplo, jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de celulosa o materiales poliméricos y haciéndola pasar a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla en polvo puede hacerse pasar a través de una máquina de comprimidos, dando lugar a trozos de forma no uniforme que se rompen para formar los gránulos. Los gránulos pueden lubricarse mediante la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral para evitar que se peguen a los moldes de vaciado de comprimidos. La mezcla con lubricante se prensa a continuación para obtener los comprimidos. Los principios activos pueden también combinarse con un excipiente inerte de flujo libre y, a continuación, prensarse directamente para obtener los comprimidos sin realizar las etapas de granulación o prensado en seco. Puede presentarse una capa protectora transparente u opaca compuesta por

una capa de sellado de laca shellac, una capa de azúcar o material polimérico y una capa brillante de cera. Pueden añadirse colorantes a estos recubrimientos para diferenciar entre distintas unidades de dosis.

5 Pueden prepararse líquidos orales, como por ejemplo, soluciones, jarabes y elixires, en forma de unidades de dosis, de modo que una cantidad determinada comprenda una cantidad preespecificada de los compuestos. Los jarabes pueden prepararse disolviendo los compuestos en una solución acuosa con un aromatizante adecuado, mientras que los elixires se preparan usando un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones pueden formularse mediante dispersión de los compuestos en un vehículo no tóxico. Pueden, asimismo, añadirse solubilizantes y emulsionantes como, por ejemplo, alcoholes de isosteárido etoxilados y éteres de polioxietilensorbitol, conservan-
10 zantes, aditivos aromatizantes, como por ejemplo, aceite de menta, edulcorantes naturales o sacarina, u otro aromati- zante artificial y similares. Las formulaciones de unidad de dosis para administración oral pueden, si se desea, estar encapsuladas en microcápsulas. La formulación también puede prepararse de manera que se prolongue o retrase la liberación, por ejemplo, recubriendo o incluyendo el material particulado en polímeros, cera y similares.

15 Los principios activos de las combinaciones según la presente invención y las sales, solvatos y derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, así como los demás principios activos pueden también administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas, como por ejemplo, vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de varios fosfolípidos como, por ejemplo, colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden administrarse como yesos independientes para un contacto próximo y prolongado con la epidermis del receptor. Por tanto, por ejemplo, el principio activo puede administrarse a partir del yeso mediante iontoforesis, como se describe en términos generales en *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986). Los compuestos farmacéuticos adaptados para la administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden administrarse en forma de supositorios o enemas. Las soluciones y suspensiones
25 para inyección preparadas según la fórmula pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

30 Resulta evidente que, además de los constituyentes especialmente mencionados anteriormente, las composicio- nes también pueden comprender otros agentes normales en la técnica con respecto al tipo de formulación en particular; por tanto, por ejemplo, las composiciones que son adecuadas para la administración oral pueden comprender aromatizantes.

Las composiciones/formulaciones farmacéuticas según la invención pueden usarse como medicamentos en medicina humana y veterinaria.

35 Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis terapéuticamente activa de cada uno de los principios activos de la combinación según la invención y del otro principio activo, depende de varios factores, como por ejemplo, la edad y el peso del animal, la enfermedad precisa que requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y el método de administración, y la determina finalmente el médico o veterinario responsable del tratamiento.

Para la administración oral de una combinación según la presente invención que contenga sal succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico y sal tetrafosfato de pironaridina como principios activos, las dosis diarias de estos dos principios activos son las siguientes:

40 Sal succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico: entre 30 mg y 1000 mg, preferiblemente entre 100 mg y 700 mg, incluso más preferiblemente entre 300 mg y 600 mg por persona y día (dosis única).

Sal tetrafosfato de pironaridina: entre 180 mg y 1000 mg, preferiblemente entre 300 y 800 mg, incluso más preferiblemente entre 400 mg y 600 mg por persona y día (dosis única).

45 Para la administración oral de una combinación según la presente invención que contenga sal succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico, sal tetrafosfato de pironaridina y artesunato como principios activos, las dosis diarias de cada uno de estos tres principios activos son las siguientes:

50 Sal succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico: entre 30 mg y 1000 mg, preferiblemente entre 100 mg y 700 mg, incluso más preferiblemente entre 300 mg y 600 mg por persona y día (dosis única).

Sal tetrafosfato de pironaridina: entre 180 y 1000 mg, preferiblemente entre 300 y 800 mg, incluso más preferible- mente entre 400 mg y 600 mg por persona y día (dosis única).

Artesunato: entre 20 y 200 mg, preferiblemente entre 100 y 200 mg, incluso más preferiblemente entre 150 mg y 180 mg por persona y día (dosis única).

Las combinaciones/composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden usarse como medicamentos en medicina humana y veterinaria.

5 En otro aspecto, la presente invención describe un método para el tratamiento y/o la prevención del paludismo en un paciente que lo necesita, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente activa de una combinación de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico (primer principio activo) y pironaridina (segundo principio activo) o un profármaco o sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores, incluidas sus mezclas en todas las proporciones. En una
10 realización específica de dicho método según la invención, también se administra al paciente artemisinina o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma (como tercer principio activo).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit (compuesto de envases independientes) para su uso en el tratamiento del paludismo que comprende en primer lugar (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente activa de la misma y, en segundo
15 lugar, pironaridina o una sal farmacéuticamente activa de la misma.

Otra realización se refiere a un kit según se describe anteriormente, donde el kit además comprende en tercer lugar artemisinina o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma (preferiblemente el kit comprende artesunato [preferiblemente artesunato de sodio] del ácido artesúnic).

20 Para los fines de la presente invención, la expresión «cantidad eficaz» indica la cantidad de un medicamento o de un principio farmacéuticamente activo que causa en un tejido, sistema, animal o ser humano la respuesta biológica o médica que busca o desea, por ejemplo, un investigador o un médico.

Además, la expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» indica una cantidad que, comparada con un sujeto concreto que no ha recibido esta cantidad, tiene las siguientes consecuencias: mejora del tratamiento, curación, prevención o eliminación de una enfermedad, síndrome, afección, dolencia, trastorno o efectos secundarios, o también la reducción de la progresión de una enfermedad, dolencia o trastorno. La expresión «cantidad
25 terapéuticamente eficaz» también abarca las cantidades que son eficaces para aumentar la función fisiológica normal.

Según se usa en este documento y a menos que se indique lo contrario, el término «profármaco» significa un derivado de un principio activo que se puede hidrolizar, oxidar o hacer reaccionar de alguna otra forma en
30 condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para producir un compuesto activo. Entre los ejemplos de profármacos se incluyen, pero sin limitaciones, derivados y metabolitos de un principio activo que incluyen restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. En determinadas realizaciones, los profármacos de compuestos con grupos funcionales carboxilo son los ésteres alquilo menores del ácido carboxílico. Los ésteres
35 de carboxilato se forman convenientemente mediante esterificación de cualquiera de los restos de ácido carboxílico presentes en la molécula. Los profármacos se pueden preparar normalmente usando métodos bien conocidos, como los descritos en Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6.^a ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y en Design and Application of Prodrugs (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmhf).

Ejemplos

40 Siempre que no se especifique lo contrario, todos los materiales de partida se obtienen a partir de proveedores comerciales y se utilizan sin purificación adicional. Siempre que no se especifique otra cosa, todas las temperaturas se expresan en °C y todos los experimentos se realizan a TA.

Abreviaturas

45	ACT	tratamiento a base de artemisinina
	Ci	curios
	CL	cromatografía líquida
	cpm	cuentas por minutos
	CsA	ciclosporina A
50	DMEM	medio de Eagle modificado de Dulbecco
	DMSO	dimetilsulfóxido
	EM	espectrometría de masas
	gp-P	glucoproteína P
	HBSS	solución salina tamponada de Hank
55	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico
	HESI	ionización por electropulverización calentada

M1	sal succinato de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
p.o.	por vía oral
5 PYRO	sal tetrafosfato de pironaridina
RPMI	medio del Roswell Park Memorial Institute
SCID	inmunodeficiencia combinada grave
TA	temperatura ambiente
10	La invención se ilustrará (pero sin limitaciones) en referencia a las realizaciones específicas descritas en los siguientes ejemplos.

I. Isobogramas *in vitro*

Los compuestos se probaron frente a formas intraeritrocíticas de *P. falciparum* derivadas de cultivos madre asíncronos de la cepa de laboratorio NF54 (cepa aislada del aeropuerto de Schiphol de origen desconocido) como se describe en Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. y Chulay, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomatic microdilution technique. Antimicrob. Agents Chemother. 1979, 16: 710-718 y Matile, H. y Pink, J.R.L. *Plasmodium falciparum* malaria parasite cultures and their use in immunology. Immunological Methods IV, 221-234, Academia Press (1990) utilizando una mezcla compuesta de RPMI 1640 suplementado con ALBUMAX® II al 0,5%, HEPES 25 Mm, NaHCO₃ 25 mM (pH 7,3), hipoxantina 0,36 mM y neomicina a 100 µg/ml como medio de cultivo. Los eritrocitos humanos de tipo A+ sirven como células huésped. Los cultivos se mantienen a 37 °C en una atmósfera de O₂ al 3 %, CO₂ al 4 % y N₂ al 93 % en cámaras modulares humidificadas. Los ensayos con los fármacos individuales se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Los compuestos se disuelven en DMSO (10 mg/ml), se prediluyen en medio de cultivo sin hipoxantina y se titulan por duplicado en 100 µl a lo largo de un rango de dilución 1:64. Tras la adición de un volumen igual de cultivo de parásito con una parasitemia del 0,3 % en una suspensión de eritrocitos al 2,5 %, las placas de ensayo se incubaron en las condiciones descritas anteriormente durante 24, 48 y 72 h. El crecimiento de los parásitos se mide mediante la incorporación de [³H]-hipoxantina marcada radiactivamente (0,25 µCi en un volumen de 50 µl de medio de cultivo sin hipoxantina) añadida 8 h (para una duración del ensayo de 24 h) o 24 h (duración del ensayo de 48 y 72 h) antes de la finalización del ensayo. Los cultivos se recogen en filtros de fibra de vidrio y se lavan con agua destilada. La radioactividad se cuenta utilizando un contador de centelleo líquido MicroBetaplate (Wallac, Zürich, Suiza) y los resultados se registran como cuentas por minuto y pocillo a cada concentración del fármaco y se expresa como porcentaje de los controles sin tratar. Las concentraciones inhibitorias del cincuenta por ciento (IC₅₀) se determinan mediante interpolación lineal (Huber, W., Hurt, N., Mshinda, H., Jaquet, C., Koella, J.C., Tanner, M. Sensitivity of *Plasmodium falciparum* field-isolates from Tanzania to chloroquine, mefloquine and pyrimethamine during *in vitro* cultivation. Acta Trop. 1993, 52: 313-6).

Los estudios de interacción de fármacos se realizan como se describe en Canfield C.J., Pudney M., Gutteridge W.E. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. Exp Parasitol. 1995, 80:373-81 y Fivelman, Q.L., Adagu I.S., Warhurst, D.C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Antimicrob Agents Chemother. 2004, 48: 4097-4102. Inicialmente, se determina la IC₅₀ de los fármacos probados solos (véase a continuación). Posteriormente, las soluciones del fármaco se diluyen con medio de cultivo sin hipoxantina a concentraciones iniciales de 10 veces la IC₅₀ predeterminada. Las soluciones (todas a 10 veces la IC₅₀) se combinan en proporciones de 1 + 3, 1 + 1 o 3 + 1. A continuación, las soluciones de fármacos únicos y en combinación se introducen en placas de 96 pocillos para obtener filas por duplicado. El resto del procedimiento es como se describe a continuación. Para la interpretación de los datos, las IC₅₀ de los fármacos en combinación se expresan como fracciones de las IC₅₀ de los fármacos solos. Estas fracciones se denominan «concentraciones inhibitorias fraccionales» (FIC) para el fármaco A y para el fármaco B, respectivamente.

$$\text{FIC Fárm. A} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ A (B)}}{\text{IC}_{50} \text{ A}}$$

- 50 **FIC Fárm. A:** concentración inhibitoria fraccional
- IC₅₀ A (B): concentración inhibitoria del 50 % del fármaco A en presencia del fármaco B
- IC₅₀ A: concentración inhibitoria del 50 % del fármaco A solo

Los valores numéricos para la interacción se obtienen y expresan como la suma de FICA y FICB. La suma de los valores de las FIC incidan los tipos de interacciones siguientes:

Antagonismo cuando Σ FIC >4,0, interacción no perjudicial cuando Σ FIC >0,5-4,0 (Odds, F.C., Antimicrob Agents Chemother. 2003, 52: 1).

Tabla 1. Ensayos de combinación de fármacos *in vitro* para M1 + PYRO.

Ratio de la combinación	Combinación de fármacos	Σ FIC NF54 24 h	Σ FIC NF54 48 h	Σ FIC NF54 72 h	Interacción 72 h
1 + 3	M1 + PYRO	1,4	1,7	1,4 ± 0,12	Interacción no perjudicial
1 + 1	M1 + PYRO	1,6	1,5	1,4 ± 0,26	Interacción no perjudicial
3 + 1	M1 + PYRO	1,3	1,3	1,4 ± 0,17	Interacción no perjudicial

5 Σ FIC (concentraciones inhibitorias fraccionales), antagonismo cuando Σ FIC >4,0, interacción no perjudicial cuando Σ FIC >0,5-4,0. Los valores muestran la media de ≥ 3 ensayos independientes para K1 y NF54, respectivamente.

10 M1 se combinó individualmente con PYRO. En el caso de la cepa NF54 de *P. falciparum* con las tres duraciones del ensayo diferentes (24 h, 48 h y convencional 72 h), se calcularon los valores de Σ FIC₅₀ a partir de ≥ 3 experimentos independientes. Estos estaban en el intervalo de 1,3-1,7, lo que sugiere que la interacción entre M1 y PYRO en las condiciones determinadas de la prueba no eran perjudiciales (tabla 1).

II. Modelo *in vivo* en ratones SCID

15 La eficacia del compuesto se evaluó frente a la cepa de *Plasmodium falciparum* Pf3D7^{0087/N9} *in vivo*. Los ratones se infectaron el día 0 por vía intravenosa con eritrocitos parasitados. En general, los ratones experimentales se trataron los días 3, 4, 5 y 6 después de la infección con dosis orales del compuesto (pauta posológica por vía oral de dosis única o durante 4 días) y se comparó la reducción de la parasitemia a día 7 con la de un grupo de control infectado (María Belen Jimenez-Díaz, Teresa Mulet, Sara Viera, Vanessa Gomez, Helen Garuti, Javier Ibanez, Angela Alvarez-Doval, Leonard D. Shultz, Antonio Martínez, Domingo Gargallo-Viola e Inigo Angulo-Barturen, Improved Murine Model of Malaria Using *Plasmodium falciparum* Competent Strains and Non-Myelodepleted NOD-scid IL2Rgammanull Mice Engrafted with Human Erythrocytes, Antimicrob Agents Chemother. 2009, 53:4533).

Vehículo

25 PYRO y M1 se solubilizaron en un vehículo compuesto por Tween-80 al 70 % y etanol al 30 %, seguido de una dilución 1:10 en H₂O. Todas las preparaciones dieron lugar a una solución líquida, transparente y de color amarillo.

Análisis farmacocinético

30 Los niveles en sangre del compuesto de prueba se evalúan para determinar los parámetros farmacocinéticos convencionales en los individuos del estudio de eficacia. Las muestras de sangre periférica (20 μ l) se obtienen a diferentes tiempos (véase el protocolo a continuación), se mezclan con 20 μ l de H₂O Milli Q y se congelan inmediatamente en hielo seco. Las muestras congeladas se conservan a -80 °C hasta su análisis. Se utiliza sangre de ratones control con fines de calibración y control de calidad. Las muestras de sangre se procesan en condiciones convencionales de extracción líquido-líquido y se analizan mediante CL-EM/EM (cuantificación mediante HESI en modo de polaridad de iones positivos).

Tabla 2. Eficacia terapéutica por vía oral de la pironaridina frente a *P. falciparum* Pf3D7^{0087/N9} durante una administración de 4 días en ratones SCID.

DÍAS POSTINFECCIÓN	% DE PARASITEMIA ²					% del control	Actividad	N ³
	3	4	5	6	7			
CONTROL ¹	0,7	1,26	3,31	5,35	9,14	-	-	4
PYRO (4 × 1 MG/KG)	0,63	1,21	3,14	4,53	7,55	82,6	17,4 %	2
PYRO (4 × 3 MG/KG)	0,71	1	0,44	0,25	0,04	0,4	99,6 %	2
PYRO (4 × 9 MG/KG)	0,7	0,28	0,15	0,063	<LIC	<LIC	100 %	2

¹sin tratamiento; ²valor medio; ³número de ratones por grupo; LIC = límite inferior de cuantificación (parasitemia <0,01 %).

Según la tabla 2, el día 7 postinfección, una dosis de 9 mg/kg p.o. de pironaridina mostraba una actividad >99,9 % y sin parásitos a día 7. La dosis de 3 mg/kg mostró una actividad del 99,6 % y las dosis restantes de 1 mg/kg mostraron una actividad insignificante (17 %) en comparación con los ratones control no tratados. PYRO inducía un aclaramiento de los parásitos en sangre periférica en comparación con una dosis de 50 mg/kg de cloroquina en el mismo sistema experimental. La ED₉₀ (es decir, la dosis de M1 en mg/kg que reduce la parasitemia el 90 % el día 7 postinfección con respecto a los ratones control no tratados) no pudo determinarse con precisión debido al número limitado de dosis, aunque se pudo reducir a un intervalo de entre 1 y 3 mg/kg.

Tabla 3. Eficacia terapéutica por vía oral de M1 frente a *P. falciparum* Pf3D7^{0087/N9} durante una administración de 4 días en ratones SCID.

DÍAS POSTINFECCIÓN	% DE PARASITEMIA ²					% del control	Actividad	N ³
	3	4	5	6	7			
CONTROL ¹	0,70	1,26	3,31	5,35	9,14	-	-	4
M1 (4 × 0,2 MG/KG)	0,85	1,33	3,10	3,35	6,55	71,7	28,3 %	
M1 (4 × 0,4 MG/KG)	0,70	1,38	1,18	0,75	0,55	6,0	94,0 %	2
M1 (4 × 0,6 MG/KG)	0,63	0,70	0,60	0,13	0,03	0,3	99,7 %	2
M1 (4 × 1,2 MG/KG)	0,50	0,75	0,43	0,05	<LIC	<LIC	100 %	2

¹sin tratamiento; ²valor medio; ³número de ratones por grupo; LIC = límite inferior de cuantificación (parasitemia <0,01 %).

Según la tabla 3, el día 7 postinfección, una dosis de 1,2 mg/kg p.o. de M1 mostraba una actividad >99,9 %. Las dosis de 0,6 y 0,4 mg/kg mostraron una actividad del 99,7% y el 94,9 % respectivamente y las dosis restantes de 0,2 mg/kg mostraron una actividad insignificante (28,3 %) en comparación con los ratones control no tratados.

M1 inducía un aclaramiento de los parásitos comparable (aunque más lento) a una dosis de 50 mg/kg de cloroquina en el mismo sistema experimental. Se calculó que la ED₉₀ era de 0,37 mg/kg (base libre) (María Belen Jimenez-Díaz, Teresa Mulet, Sara Viera, Vanessa Gomez, Helen Garuti, Javier Ibanez, Angela Alvarez-Doval, Leonard D. Shultz, Antonio Martínez, Domingo Gargallo-Viola e Inigo Angulo-Barturen, Improved Murine Model of Malaria Using *Plasmodium falciparum* Competent Strains and Non-Myelodepleted NOD-scid IL2Rgammanull Mice Engrafted with Human Erythrocytes, Antimicrob Agents Chemother. 2009, 53:4533).

Tabla 4. Eficacia terapéutica por vía oral de la combinación M1 + PYRO frente a *P. falciparum* Pf3D7^{0087/N9} durante una administración de 4 días.

ENTRADA	días postinfección		% DE PARASITEMIA ²						N ³
			3	4	5	6	7	10	
1	M1 (0 mg/kg)	PYRO (0 mg/kg)	1,07	2,18	5,04	9,15	12	X	4
2	M1 (4 × 1,2 mg/kg)	PYRO (0 mg/kg)	0,99	1,04	0,7	0,12	0,01	<LIC	2
3	M1 (0 mg/kg)	PYRO (4 × 3 mg/kg)	1,16	0,67	0,08	0,01	<LIC	<LIC	2
4	M1 (4 × 0,4 mg/kg)	PYRO (4 × 3 mg/kg)	0,96	0,70	0,09	<LIC	<LIC	<LIC	2
		ratio	1,21	0,94	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	-
5	M1 (0 mg/kg)	PYRO (4 × 9 mg/kg)	1,09	0,34	0,05	<LIC	<LIC	<LIC	2
6	M1 (4 × 1,2 mg/kg)	PYRO (4 × 9 mg/kg)	1,18	0,14	0,06	0,01	<LIC	<LIC	2
		ratio	0,93	2,41	0,83	n.d.	n.d.	n.d.	-
7	M1 (0 mg/kg)	PYRO (4 × 30 mg/kg)	1,13	0,14	0,02	0,01	<LIC	<LIC	2
8	M1 (4 × 1,2 mg/kg)	PYRO (4 × 30 mg/kg)	1,07	0,17	0,03	0,01	<LIC	<LIC	2
		ratio	1,06	0,83	0,50	1,00	n.d.	n.d.	-

¹control; ²valor medio; ³número de ratones por grupo; LIC = límite inferior de cuantificación (parasitemia <0,01 %); n.d.: no determinado.

En la tabla 4 se resumen los datos farmacodinámicos (% de parasitemia) cuando se combinan M1 y pironaridina en el mismo sistema experimental *in vivo*.

La entrada 1 muestra el porcentaje (%) de parasitemia cuando se permite que en el grupo no tratado (control) la parasitemia alcance al 12 % de los eritrocitos totales a día 7 postinfección. La entrada 2 muestra el % de parasitemia de M1 a la concentración máxima de parásitos (CMP) y una fase de latencia de 48 h que podría observarse antes del aclaramiento del parásito es eficaz para alcanzar el LIC a día 10.

Basándose en la ratio del % de parasitemia en el grupo de combinación en comparación con la monoterapia según se indica en las entradas de PYRO 3 y 4, 5 y 6, y 7 y 8, parece que M1 no afecta al aclaramiento de parásitos inducido por PYRO los días 4 y 5, cuando se necesita una muerte más rápida de los parásitos.

10 **III. Permeabilidad *in vivo* en células Caco-2**

Las células Caco-2 se mantienen en medio DMEM en una atmósfera de CO₂ al 8,5 %. Para los experimentos de transporte se siembran 0,125 × 10⁶ células/pocillo en insertos de filtro de policarbonato y se deja que crezcan y se diferencien durante 14 ± 1 días antes de utilizar las monocapas de células en los experimentos. Los experimentos de transporte de fármacos se llevan a cabo mediante un método de cóctel en un entorno de cuatro dimensiones. Los coeficientes de permeabilidad aparente se determinan para las direcciones A (apical) → B (basolateral) y B → A con y sin presencia de CsA como inhibidor del transportador. Se disuelven hasta 5 elementos de ensayo y compuestos de referencia en una solución salina equilibrada de Hank a pH 7,4 para obtener una concentración final de 1 μM. Los ensayos se llevan a cabo en HBSS que contiene HEPES 25 mM (pH 7,4) en una atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. Antes del estudio, las monocapas se lavan con HBSS precalentado. Al inicio de los experimentos se añade HBSS precalentado con los elementos de ensayo al lado donador de la monocapa y HBSS sin los elementos de ensayo al lado receptor. Las capas se agitan a 150 rpm a 37 °C durante el experimento. Tras 2 h, el inserto Transwell que contiene la monocapa se retira con cuidado y se coloca en una nueva placa, se toman alícuotas tanto del lado receptor como del donador y se diluyen con un volumen igual de acetonitrilo que contiene patrón interno. La mezcla se centrifuga y el sobrenadante se analiza mediante CL-EM/EM. Los coeficientes de permeabilidad aparente (Pap) se calculan utilizando la fórmula:

$$\text{Pap} = [\text{Vrec}/(\text{A} \times \text{C0, donador})](\text{dCrec}/\text{dt}) \times 10^6$$

donde dCrev/dt es la variación en la concentración del compartimento receptor con el tiempo, Vrec es el volumen de la muestra en el compartimento receptor, C0, donador es la concentración en el compartimento del donador a tiempo 0 y A es el área del compartimento con las células.

Tabla 7. Coeficiente de permeabilidad y ratio de M1 en la monocapa de Caco-2 en presencia o ausencia de ciclosporina A.

DIRECCIÓN ¹	INHIBIDOR DE GP-P	PAP (10E-6 CM/S)	RECUPERACIÓN (%)	RATIO DE SALIDA
APICAL A BASOLATERAL (A-B)	no	2,97	79,8	18,2
BASOLATERAL A APICAL (B-A)	no	54,2	65,4	
APICAL A BASOLATERAL (A-B)	CsA ²	14,4	72,5	1,53
BASOLATERAL A APICAL (B-A)	CsA ²	22	86,3	

¹El pH en las cámaras apical/basolateral fue 7,4/7,4. ²La ciclosporina A se incubó a 10 μM.

En las células Caco-2 en monocapa, los transportadores gp-P expulsan M1 con una ratio de 18,2 (tabla 7). La permeabilidad puede reestablecerse mediante un inhibidor de gp-P como la CsA cuando la ratio cae a 1,53, lo que permite unas tasas similares para el paso de M1 del lado apical al basolateral y viceversa de la monocapa de Caco-2.

Tabla 8. Coeficiente de permeabilidad y ratio de M1 en la monocapa de Caco-2 en presencia o ausencia de PYRO.

CONCENTRACIÓN DE PYRO (μM)	PAP (10E-6 CM/S)	PAP (A-B) ² (10E-6 CM/S)	PAP (B-A) ³ (10E-6 CM/S)	RATIO DE SALIDA
0	7,8	2,00	30,55	15,44

ES 2 994 600 T3

0,3	9,74	3,07	30,90	10,07
1	8,25	2,17	31,40	14,47
3	12,27	3,85	39,10	10,16
10	11,34	3,42	37,60	10,99
30	16,40	7,29	36,90	5,06
100	30,02	19,30	46,70	2,42

¹El pH en las cámaras apical/basolateral fue 7,4/7,4. ²APICAL A BASOLATERAL. ³BASOLATERAL A APICAL

La permeabilidad de M1 aumentaba con el aumento de las concentraciones de PYRO con una PapA-B = 2,00 sin PYRO a 19,3 con 100 μ M de PYRO. Las ratios de salida disminuyeron de 15,44 sin PYRO a 2,42 con 100 μ M de pironaridina.

- 5 PYRO inhibe la salida mediada por gp-P de M1 a concentraciones superiores a 10 μ M.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación que comprende como primer principio activo (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y como segundo principio activo pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. Una combinación según la reivindicación 1, que comprende como tercer principio activo artemisinina o un derivado o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que el derivado de artemisinina se selecciona entre el grupo compuesto por: dihidroartemisina y arteméter, artesunato.
- 10 3. Una combinación según la reivindicación 2, en la que el tercer principio activo es artesunato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Una combinación según la reivindicación 3, en la que la sal farmacéuticamente aceptable de artesunato es una sal que se selecciona entre el grupo compuesto por: sales de sodio y sales de potasio.
- 15 5. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la combinación comprende (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico, tetrafosfato de pironaridina y artesunato de sodio.
6. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los principios activos se administran de manera simultánea o secuencial.
7. Una combinación que comprende según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento y/o prevención del paludismo.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende como principios activos dosis terapéuticamente activas de (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y pironaridina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y también al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento y/o la prevención del paludismo.
- 25 9. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8 que comprende como principio activo adicional una dosis terapéuticamente activa de artesunato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 10. Un kit para su uso en el tratamiento del paludismo, que comprende en primer lugar (2-pirrolidin-1-il-etil)-amida del ácido 6-fluoro-2-(4-morfolin-4-ilmetil-fenil)-quinolin-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente activa de la misma y, en segundo lugar, pironaridina o una sal farmacéuticamente activa de la misma.
11. Un kit para su uso según la reivindicación 10, que además comprende artesunato de sodio.