(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
12 de enero de 2017 (12.01.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/005954 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/165 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2016/070497

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de julio de 2016 (02.07.2016)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201530964 3 de julio de 2015 (03.07.2015) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real., Avda. Del Hospicio S/n, 18071 Granada (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **LEÓN LÓPEZ, Josefa**; Fundación Fibao, C/ Dr. Azpitarte 4,4ª Planta, EdificioLicinio de la Fuente, 18012 Granada (ES). **CASADO RUÍZ, Jorge**; Fundación Fibao, C/ Dr. Azpitarte 4,4ª Planta, EdificioLicinio de la Fuente, 18012 Granada (ES). **SALMERÓN CASTELAR, Javier**; Fundación Fibao, C/ Dr. Azpitarte 4,4ª Planta, EdificioLicinio de la Fuente, 18012 Granada (ES). **JIMÉNEZ RUÍZ, Sergio Manuel**; Universidad De Granada - Otri, Centro De Transferencia Tecnológica. 3ª Planta, Gran Vía De Colón, 48, 18071 Granada (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

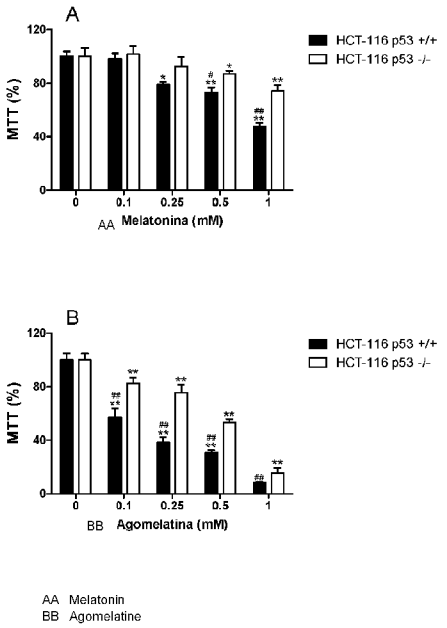
(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

[Continúa en la página siguiente]

(54) **Title**: MELATONIN ANALOGUES FOR TREATING CANCER

(54) **Título** : ANÁLOGOS DE LA MELATONINA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Fig.1



AA Melatonin
BB Agomelatine

(57) **Abstract**: The present invention demonstrates that the compound N-[2-(7-methoxynaphthalen-1-yl) ethyl] acetamide (agomelatine) inhibits the growth of colon cancer cell lines *in vitro* as well as *in vivo*, suggesting the oncostatic/cytotoxic role of this compound. The lines having wild-type p53 demonstrated higher levels of inhibition than those having mutant p53. The effect of the compound depends on the state, mutated or unmutated, of p53, although, unlike melatonin or 5-fluorouracil, the compound is also able to inhibit growth when p53 is mutated, thereby increasing the number of treatable patients.

(57) **Resumen**: La presente invención muestra que el compuesto: *N-[2-(7-metoxinaftalen-1-il)etil]acetamida* (agomelatina), inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon *in vitro*, así como la inhibición *in vivo*, lo que sugiere el papel oncostático/citotóxico de este compuesto. Las líneas que presentan un p53 salvaje mostraron niveles más altos de inhibición que los que presentan un p53 mutado. Su efecto depende del estado, mutado o no mutado de p53, si bien, y al contrario que la melatonina o el 5-fluorouracilo, también es capaz de inhibir el crecimiento en el caso de que p53 se encuentre mutado, con lo que el número de pacientes tratables aumenta.

WO 2017/005954 A1

IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

ANÁLOGOS DE LA MELATONINA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de agomelatina (N-[2-(7-metoxinaftalen-1-il)etil]acetamida) y de composiciones farmacéuticas que comprendan agomelatina para la prevención, y/o tratamiento del cáncer, y más concretamente, del cáncer de colon.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer colorrectal es una neoplasia cuya frecuencia ha ido aumentando en los últimos años y será uno de los tumores malignos más importantes a nivel poblacional en el futuro cercano. Los eventos genéticos que conducen a la aparición de cáncer de colon han sido bien caracterizados, sin embargo.

El modelo de la progresión de las alteraciones genéticas en el cáncer de colon es un hecho conocido y aceptado. Entre ellas, destaca la mutación del gen supresor de tumores p53 (Vogelstein et al., 1998. *The genetic basis of human cancer. Colorectal tumors Chapter* 31.1 ed. New York Mac Graw Hill: 565-87; Cho & Vogelstein 1992. *J Cell Biochem Suppl*: 137-41). Este gen considerado como el guardián del genoma humano, cuya función normal es impedir la replicación de células con material genético dañado a través de una inhibición de la replicación transcripcional e inducción de la apoptosis celular. Las mutaciones en el gen p53 favorecen la transformación maligna celular. Estas mutaciones comprometen en el 98% de los casos a los exones 5 al 9 que corresponden al material genético ubicado entre los codones 100 a 300, donde algunos de estos codones presentan una mayor frecuencia de mutaciones y son conocidos como "*hot spots*" (Vogelstein et al., 1998. *The genetic basis of human cancer. Colorectal tumors Chapter* 31.1 ed. New York Mac Graw Hill: 565-87; Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1992 14; 326:1350-2; Levine *et al.,* 1994. *J Lab Clin Med* 123: 817-23;

La melatonina es una indolamina derivada del triptófano, originalmente identificada como el principal producto de la glándula pineal, pero que se sintetiza también en otros órganos. Este compuesto puede llevar a cabo sus efectos a través de sus receptores de membrana (MT1 y MT2, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G) o nuclear (RZR/ROR). También puede interaccionar directamente con proteínas citoplasmáticas como la calmodulina o la PKC. Una de las acciones más conocidas de la

melatonina es su capacidad para depurar de radicales libres. También puede aumentar la expresión de enzimas antioxidantes (como la superóxidodismutasa, la glutationperoxidasa y la glutationreductasa) y, en cambio, inhibir la expresión de enzimas prooxidantes como la NOS (Jung y Ahmad, 2006. *Cancer Res.* ;66(20):9789-93).

La capacidad de esta indolamina para inhibir el crecimiento y desarrollo de tumores se conoce desde hace décadas (Jung y Ahmad, 2006. *Cancer Res.* ;66(20):9789-93). Esta indolamina afecta a la proliferación celular en gran variedad de líneas celulares tumorales, tanto en concentraciones fisiológicas como farmacológicas. El mecanismo intracelular de estos efectos parece variar de un sistema a otro. En algunos modelos se ha propuesto como responsable a su receptor de membrana, mientras que en otros se ha implicado a su capacidad para unirse a la calmodulina. En células de glioma de rata, la incubación con dosis farmacológicas de melatonina inhibe el crecimiento e induce parada de ciclo celular debido a cambios en el estado rédox celular por inactivación de la vía RTK/PKC/Akt/NF-kappaB (). Además de sus efectos como oncostático, la melatonina puede inhibir la capacidad de invasión y metástasis así como el proceso de angiogénesis. En efecto, en células de cáncer de próstata, induce diferenciación neuroendocrina por un mecanismo independiente de PKA (Sainz y cols., 2004. *Prostate*. 63(1):29-43). En células MCF-7 de cáncer de mama y a dosis fisiológicas, promueve diferenciación celular y aumenta la expresión de la subunidad integrina β-1y E-caderina En este tipo de cáncer inhibe la proliferación e invasión debido a su interacción con las vías de señalización del receptor de estrógenos (Cos y cols., 2008. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Dec;8(8):691-702).

En el caso de células en cultivo de cáncer de colon del tipo colo 38, la melatonina induce apoptosis, tanto in vivo como in vitro, a través de un mecanismo que implica a su receptor nuclear (Winczyk y cols., 2001. *J Pineal Res.* 31(2):179-82) y de membrana MT1, mientras que en HT-29 lo hace a través de sus efectos antioxidantes (García-Navarro y cols., 2007. *J Pineal Res.* 43(2):195-205) y puede actuar sinergísticamente con antagonistas selectivos del receptor de colecistoquinina-A (CCK-A) (González-Puga y cols., 2004). Más recientemente se ha demostrado que su efecto inhibidor en este tipo de tumores depende del estatus p53 de las células en cultivo.

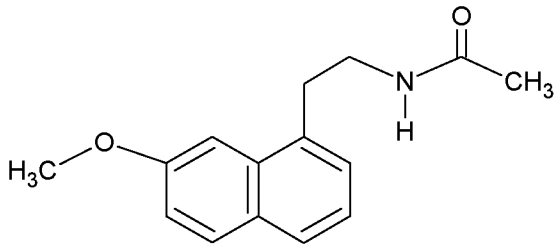
La agomelatina es un agonista específico de los receptores MT1 / MT2. También tiene actividad antagonista de 5-HT2C. Se utiliza en el tratamiento de la condición depresiva importante. La agomelatina aumenta la liberación de noradrenalina y dopamina específicamente en la corteza frontal y no tiene influencia sobre los niveles extracelulares de serotonina. Valdoxan es el primer antidepresivo melatoninérgico. Funciona mediante el bloqueo de los receptores 5HT2C, que normalmente son activados por el neurotransmisor

serotonina. Cuando se activa, éstos causan la ansiedad, la depresión, la ansiedad social y trastornos compulsivos. También aumenta los niveles de dopamina y norepinefrina en el cerebro, que están asociados con la depresión, y esto mejora y eleva el estado de ánimo.

Sin embargo, en el momento actual no se sabe si la agomelatina tendría el mismo efecto frente al cáncer que la melatonina, ya que existen varios mecanismos moleculares asociados a este efecto. Es necesario, por tanto, determinar si la agomelatina puede actuar como una alternativa al tratamiento del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **aspecto** de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):



(I)

o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer. Alternativamente, se refiere al compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, alivio y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

Aún más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de colon.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 no mutado (salvaje). En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

El gen p53, normalmente, cuando se presentan mutaciones del DNA en cualquiera de los cromosomas, induce que el ciclo celular G1 se detenga. Esta función aparentemente da tiempo para que el reparo de la mutación se realice. Si el reparo no es posible el p53 induce la muerte celular apoptótica. Cuando ambas copias p53 mutan, el gen no es funcional, y las mutaciones a través del genoma persisten y se acumulan. El p53 mutado (disfuncional) está presente en el 50% de todos los cánceres humanos.

Las alteraciones de este gen pueden estudiarse a nivel de su producto proteico con técnicas de inmunohistoquímica (Roa et al., 1997.. *Rev Méd Chil* 125: 523-9), inmunoprecipitación (Van Meir et al., 1994. *Cancer Res* 54: 649-52)9; a nivel cromosómico (hibridación in situ, FISH) (Williams *et al.,* 1999. *Exp Mol Pathol* 67: 135-43); a nivel génico con técnicas de biología molecular basadas en la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Entre estas últimas están el polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) (Tamura *et al.,* 1991. *Cancer Res* 51: 3056-8; Lang *et al.,* 1999. *Gut* 44: 822-5), la electroforesis en gel gradiente de denaturación (DGGE) Hamelin *et al.,* 1993. *Oncogene* 8: 2213-20, Van Orsouw *et al.,* 1999. *Genet Anal* 14: 205-13), análisis de heteroduplex (Tsongalis *et al.,* 1994. *Clin Chem* 40: 485-6

Otro **aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprenden al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. Alternativamente, se refiere una composición farmacéutica que comprenden al menos un compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. En una realización preferida de este aspecto, la composición de la invención además comprende un transportador o *carrier* farmacéuticamente aceptable, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la invención comprende como único principio activo un compuesto de la invención, o un tautómero, una

sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, aunque puede comprender adicionalmente otros excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

Aún más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de colon.

Tal y como se muestra en los ejemplos de la invención, la agomelatina es útil en el tratamiento tanto del cáncer con p53 mutado como del cáncer con p53 no mutado, presentando una mayor efectividad en aquellos cáncers con p53 no mutado. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer de colon es un cáncer con p53 no mutado (salvaje). En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una composición alimentaria o bien una composición nutracéutica o bien una composición del tipo "*medical food*", de ahora en adelante composición alimentaria de la invención, que comprende al menos el compuesto de la invención.

En otra realización preferida de este aspecto, la composición alimentaria o nutracéutica de la invención comprende como único principio activo un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, aunque puede comprender adicionalmente otros excipientes y/o vehículos nutracéuticamente aceptables.

Otro **aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención para la prevención, mejora, alivio o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. Alternativamente, se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención, para la prevención y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. En una realización preferida, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

Aún más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de colon.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 no mutado (salvaje). En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la prevención, mejora, alivio o tratamiento de un sujeto, preferiblemente humano, que padezca un cáncer, preferiblemente cáncer de colon, y aún más preferiblemente cáncer de colon p53 no mutado (salvaje), que comprende la administración del compuesto de la invención o bien de la composición farmacéutica de la invención. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 mutado. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una preparación combinada que comprende:

a. Un componente A: que se selecciona de entre un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica de la invención según se describe en la memoria, y
b. Un componente B: que comprende un principio activo que se selecciona de la lista que consiste en un derivado de pirimidina, un derivado del platino, raltitrexed, paclitaxel, doxorubicina, un derivado de camptotecina, o cualquiera de sus combinaciones.

Otro **aspecto** de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención para la prevención, mejora, alivio o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. Alternativamente, se refiere la preparación combinada de la invención, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. En una realización preferida, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

Aún más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de colon.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 no mutado (salvaje). En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Inhibición de la proliferación celular por melatonina (A) y agomelatina (B) en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 y HCT-116 p53 -/-. Los datos representan la media ± E.E.M de tres experimentos realizados por triplicado. *P<0.01 vs 0; **P<0.001 vs 0; #P<0.01 vs HCT-116 p53 -/-; ##P<0.001 vs HCT-116 p53 -/-.

Figura 2. La presencia de luzindol (antagonista de los receptores MT1 y MT2) no influye en el efecto inhibidor sobre el crecimiento de las células HCT-116 de la melatonina (A) o la agomelatina (B). De la misma forma, la presencia de Ro 60-0175 (agonista de los receptores 5-HT2C) no afecta a la inhibición del crecimiento de las células HCT-116 (C) por la agomelatina. Los datos representan la media ± E.E.M de tres experimentos realizados por triplicado. *P<0.01 vs 0; **P<0.001 vs 0.

Figura 3. Porcentaje de distribución en las diferentes etapas del ciclo celular tras el tratamiento con melatonina (A, B) y agomelatina (C, D) de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 -/-. Los datos representan la media ± E.E.M de tres experimentos realizados por duplicado. *P<0.01 vs control; **P<0.001 vs control.

Figura 4. Actividad fosfatasa alcalina tras los tratamientos con melatonina (A) y agomelatina (B) de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 -/-. Los datos representan la media ± E.E.M de tres experimentos realizados por triplicado. **P<0.001 vs control.

Figura 5. Porcentaje de apoptosis tras el tratamiento con melatonina (A) y agomelatina (C) en las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 -/-. Los datos representan la media ± E.E.M de tres experimentos realizados por duplicado. *P<0.01 vs control; **P<0.001 vs control.

Figura 6. Expresión de caspasa 3 tras el tratamiento de las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 -/- con diferentes dosis de melatonina y agomelatina durante 48 horas.

Figura 7. Expresión de los genes del reloj circadiano Per1, Per2, Per3 y Clock, tras el tratamiento con melatonina y agomelatina en las líneas celulares HCT-116 (A,B) y HCT-116 p53 -/- (C,D). *P<0.01 vs control; **P<0.001 vs control.

Figura 8. Actividad antioxidante de las líneas celulares HCT-116 (A, B) y HCT-116 p53 -/- (C, D) tras el tratamiento con melatonina y agomelatina. En cada situación el experiment se realize tres veces y se analizaron 6 muestras por grupo.

Figura 9. Efecto antitumoral in vivo en ratones desnudos de la cepa Balb/c nu/nu. Se realizó la inyección subcutánea de unas 10^6 células HCT-116 (A) y HCT-116 p53 -/- (B) en ambos flancos del animal. Una vez que el tumor alcanzó 100 mm^3 de volumen, se trataron con agomelatina (5 mg/Kg), melatonina (5 mg/Kg) y 5-FU (50 mg/Kg) tres veces a la semana durante dos semanas. Se utilizaron 8 animales por grupo de tratamiento.

Figura 10. Niveles séricos de glucosa (A), urea (B), ALT (C), AST (D), ácido úrico (E) y amilasa (F) en ratones desnudos de la cepa Balb/c nu/nu, tras el traamiento con agomelatina (5 mg/Kg), melatonina (5 mg/Kg) y 5-FU (50 mg/Kg) durante dos semanas. *P<0.05 vs control; **P<0.01 vs control. Control de pesos durante los tratamientos (G).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

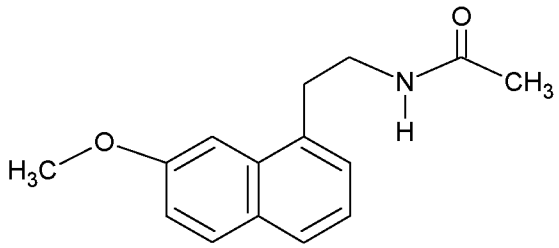
Los resultados que se presentan en la invención muestran por primera vez que el compuesto: *N-[2-(7-metoxinaftalen-1-il)etil]acetamida* (agomelatina), inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon in vitro, así como la inhibición in vivo, lo que sugiere el papel oncostático/citotóxico de este compuesto. Las líneas que presentan un p53 salvaje mostraron niveles más altos de inhibición que los que presentan un p53 mutado. Su efecto depende del estado, mutado o no mutado de p53, si bien, y al contrario que la melatonina o el 5-fluorouracilo, también es capaz de inhibir el crecimiento en el caso de que p53 se encuentre mutado, con lo que el número de pacientes tratables aumenta.

La agomelatina inhibe el crecimiento tumoral, induce parada de ciclo celular y apoptosis dependiente de caspasas. La parada del ciclo celular está asociada a un incremento de la diferenciación celular. In vivo, el efecto obtenido es 10 veces superior al que produce el 5-FU, primera línea de tratamiento quimioterápico frente al CCR en la clínica. Además, la agomelatina tiene menos efectos secundarios que el 5-fluorouracilo, con lo que podría considerarse para el tratamiento de este tipo de cáncer y de otros en los que el 5-fluorouracilo se utilice como tratamiento.

Es decir, la invención se refiere al uso de la N-[2-(7-metoxinaftalen-1-il)etil]acetamida en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento del cáncer, preferiblemente del cáncer de colon, y aún más preferiblemene de un cáncer con p53 no mutado.

USO MÉDICO DEL COMPUESTO DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, un **primer aspecto** de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) (también referido como el compuesto de la invención):



(I)

o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, alivio y/o tratamiento del del cáncer. Alternativamente, se refiere al compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, alivio y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

Aún más preferiblemente, el cáncer es el cáncer de colon.

Los ejemplos de la invención muestran que la agomelatina induce un efecto que depende de p53, siendo más potente cuando este gen se encuentra en estado salvaje *in vitro*, mientras que *in vivo* no se encuentran diferencias en el modelo. La melatonina tiene también un efecto que depende del estatus del gen p53, pero, a diferencia de la agomelatina, no inhibe el crecimiento tumoral in vivo en el caso de que p53 esté mutado, aunque in vitro sí se observa efecto inhibidor, únicamente a las concentraciones mayores.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 no mutado (salvaje), aunque la agomelatina también es efectiva, en casos de cáncer p53 mutado, por lo que en otra realización preferida, el cáncer es un cáncer con p53 mutado. Métodos para detectar si un cáncer presenta p53 mutado son conocidos en el

estado de la técnica, entre los que se encuentran, pero sin limitarse, los que se describen más abajo en la presente memoria.

El gen p53, normalmente, cuando se presentan mutaciones del DNA en cualquiera de los cromosomas, induce que el ciclo celular G1 se detenga. Esta función aparentemente da tiempo para que el reparo de la mutación se realice. Si el reparo no es posible el p53 induce la muerte celular apoptótica. Cuando ambas copias p53 mutan, el gen no es funcional, y las mutaciones a través del genoma persisten y se acumulan. El p53 mutado (disfuncional) está presente en el 50% de todos los cánceres humanos.

Las alteraciones de este gen pueden estudiarse a nivel de su producto proteico con técnicas de inmunohistoquímica (Roa et al., 1997.. *Rev Méd Chil* 125: 523-9), inmunoprecipitación (Van Meir et al., 1994. *Cancer Res* 54: 649-52)9; a nivel cromosómico (hibridación in situ, FISH)(Williams *et al.,* 1999. *Exp Mol Pathol* 67: 135-43); a nivel génico con técnicas de biología molecular basadas en la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Entre estas últimas están el polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) (Tamura *et al.,* 1991. *Cancer Res* 51: 3056-8; Lang *et al.,* 1999. *Gut* 44: 822-5), la electroforesis en gel gradiente de denaturación (DGGE) Hamelin *et al.,* 1993. *Oncogene* 8: 2213-20, Van Orsouw *et al.,* 1999. *Genet Anal* 14: 205-13), análisis de heteroduplex (Tsongalis *et al.,* 1994. *Clin Chem* 40: 485-6) y secuenciación de los segmentos génicos amplificados (King *et al.,* 1995. *Cancer* 1995; 75: 2700-5).

En la presente invención se entiende por “cáncer” una amplia gama de condiciones causadas por una proliferación excesiva de células malignas (también conocidas como cancerígenas o cancerosas), con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado (crecimiento y división más allá de los límites normales, invasión del tejido circundante y, a veces, metástasis). Comprende cualquier enfermedad de un órgano o tejido en un mamífero, preferiblemente el hombre, caracterizado por una multiplicación pobremente controlada, o descontrolada, de células normales o anormales en dicho tejido, y su efecto en la totalidad del cuerpo. El término cáncer, dentro de esta definición, incluye las neoplasias benignas, displasias, hiperplasias, así como neoplasias que muestran metástasis, o cualquier otra transformación como por ejemplo, leucoplasias que a menudo preceden al brote del cáncer. Las células y los tejidos son cancerosos cuando crecen y se replican más rápidamente de lo normal, desplazándose o dispersándose en el tejido sano circundante o cualquier otro tejido del cuerpo, lo que se conoce como metástasis, asume formas y tamaños anormales, muestra cambios en su ratio nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, y finalmente cesa. Células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como un todo causando síndromes paraneoplásicos, o si el cáncer ocurre en un

órgano o tejido vital, siendo interrumpida o dañada su función normal, con posibles resultados fatales. El resultado final de la evolución de un cáncer que involucra un órgano vital, ya sea primario o metastático, es la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a extenderse, y su grado de extensión se relaciona normalmente con cambios en la supervivencia a la enfermedad.

Generalmente se dice que el cáncer se encuentra en uno de tres estados de crecimiento: temprano o localizado, cuando el tumor aún se encuentra confinado en el tejido de origen, o en su localización primaria; extensión directa, cuando las células cancerígenas del tumor han invadido el tejido adyacente o se ha extendido únicamente a los nodulos linfáticos regionales; o metástasis, cuando las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde la localización primaria, por medio del sistema circulatorio o linfático, y se ha establecido en localizaciones secundarias.

Se dice que un cáncer es maligno por su tendencia a causar la muerte si no es tratado. Los tumores benignos, usualmente no causan la muerte, aunque pueden hacerlo si interfieren con la función normal del cuerpo por sus características o localización, tamaño o efectos paraneoplásicos. Aquí los tumores malignos caen dentro de la definición de cáncer dentro del ámbito de esta definición también. En general, las células cancerosas se dividen a una tasa mayor que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de los tejidos cancerosos y normales no es tanto que la división celular sea mucho más rápido, como la pérdida parcial o completa de detener su crecimiento y de diferenciarse en un tejido útil y limitado, del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento del tejido normal.

El tejido canceroso puede expresar ciertas moléculas receptoras y probablemente están influenciadas por la susceptibilidad e inmunidad, y se sabe que ciertos cánceres de la próstata y de mama, por ejemplo, dependen de ciertas hormonas. El término "cáncer" en esta memoria, no se limita simplemente a neoplasias benignas, sino que comprende también otras neoplasias benignas o malignas como: 1) Carcinoma, 2) Sarcoma, 3) Carcinosarcoma, 4) Cánceres de los tejidos formadores de sangre, 5) tumores de tejidos nerviosos, incluyendo el cerebro, 6) cáncer de células de la piel.

El carcinosarcoma ocurre en los tejidos epiteliales, que cubren la cara externa del cuerpo (la piel) y las membranas mucosas y la cavidad interna de la estructura de los órganos, tales como las mamas, el pulmón, el tracto digestivo y gastrointestinal, las glándulas endocrinas, y el sistema genitourinario. Los elementos ductales o glandulares pueden persistir en los tumores epiteliales, así como en los adenocarcinomas, como por ejemplo, el adenocarcinoma de tiroides, el adenocarcinoma gástrico, el adenocarcinoma uterino. Cánceres del epitelio de células pavimentadas de la piel y de ciertas membranas mucosas,

como por ejemplo, cáncer de lengua, labios, laringe, vejiga urinaria, cerviz uterina, o pene, puede ser denominado carcinoma epidermoide o de células escuamosas de los tejidos respectivos, y se encuentran también dentro de la definición de cáncer en esta memoria.

El sarcoma se desarrolla en los tejidos conectivos, incluyendo el tejido fibroso, adiposo, el músculo, los vasos sanguíneos, hueso, y el cartílago como por ejemplo el sarcoma osteogénico, liposarcoma, fibrosarcoma, y el sarcoma sinovial.

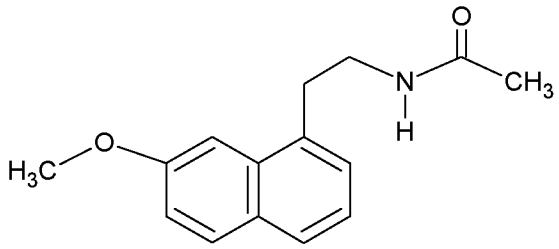
Los carcionosarcomas se desarrollan tanto en el tejido epitelial como en el conectivo. El cáncer puede ser primario o secundario. Primario indica que el cáncer se ha originado en el tejido que se ha encontrado, en lugar de haberse establecido tras metástasis desde otra región.

El cáncer y las enfermedades tumorales, pueden ser también benignos o malignos, y pueden afectar a las estructuras anatómicas del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo, pero sin limitarnos, pueden ser: I) cáncer y enfermedades tumorales de la médula ósea, y de células derivadas de la médula ósea (leucemias); II) glándulas endocrinas y exocrinas, como por ejemplo, tiroides, paratiroides, pituitaria, glándulas adrenales, glándulas salivares, páncreas; III) de mama, como por ejemplo, tumores benignos y malignos en las glándulas mamarias tanto de hombres como de mujeres, los conductos mamarios, adenocarcinoma, carcinoma medular, comedo carcinoma. La enfermedad de Paget del pezón, el carcinoma inflamatorio de mujeres jóvenes,...; IV) El pulmón; V) El estómago; VI) El hígado y el bazo; VII) El intestino delgado, VIII) El Colon; IX) El hueso, y sus tejidos conectivos y de soporte, como el tumor de huesos maligno o benigno, por ejemplo, el sarcoma osteogénico maligno, el osteoma benigno, los tumores de cartílago; como el condrosarcoma maligno o el condroma benigno; tumores de la médula ósea, como el mieloma maligno, o el granuloma eosinofílico benigno, así como tumores metastáticos de los tejidos óseos en otras localizaciones del cuerpo; X) la boca, cuello, laringe, y el esófago; XI) La vejiga urinaria y los órganos y estructuras internas y externas del sistema urogenital masculino y femenino, como ovario, útero, cerviz del útero, testículos y glándula prostética; XII) La próstata; XIII) El páncreas, como el carcinoma ductal del páncreas; XIV) El tejido linfático como linfomas y otros tumores de origen linfoide; XV) La piel; XVI) Cáncer y enfermedades tumorales de todas las estructuras anatómicas pertenecientes al sistema respiratorio, incluyendo los músculos torácicos y la pleura; XVII) cáncer primario y secundario de los nódulos linfáticos, XVIII) La lengua y las estructuras óseas del paladar y de los senos; XIX) La boca, pómulos, cuello y glándulas salivares; XX) Los vasos sanguíneos incluyendo el corazón y sus membranas; XXI) El músculo liso o esquelético, incluyendo sus ligamentos y membranas;

XXII) El sistema nervioso periférico, autónomo y central, incluyendo el cerebelo; XXIII) El tejido adiposo.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente, es el cáncer de colon.

La agomelatina es un compuesto con número CAS 138112-76-2, fórmula C15H17NO2, denominación de la IUPAC: N-[2-(7-metoxinaftalen-1-il)etil]acetamida, y Fórmula (I):



Fórmula (**I**)

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples, incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “prodroga” o “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye cualquier derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se

administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento o composiciones alimentarias, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, preferiblemente una farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, junto con un transportador o carrier

farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un vehículo, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. Alternativamente, se refiere una composición, de ahora en adelante composición de la invención, preferiblemente una composición farmacéutica que comprenden al menos un compuesto de la invención o cualquiera de sus sales, preferiblemente cualquier sal farmacéuticamente aceptable, ésteres, tautómeros, polimorfos, hidratos farmacéuticamente aceptables, o un isómero, profármacos, derivados, solvatos o análogos, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. En una realización preferida de este aspecto, la composición de la invención además comprende un transportador o *carrier* farmacéuticamente aceptable, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la invención comprende como único principio activo un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, aunque puede comprender adicionalmente otros excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

En otra realización preferida, el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer es el cáncer de colon. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es un cáncer con p53 no mutado (salvaje), aunque, también es efectiva, en casos de cáncer p53 mutado, por lo que en otra realización preferida, el cáncer es un cáncer con p53 mutado. Métodos para detectar si un cáncer presenta p53 mutado son conocidos en el estado de la técnica, entre los que se encuentran, pero sin limitarse, los que han sido descritos previamente en la presente memoria.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

La composición farmacéutica de la invención comprenderá al menos un compuesto de la invención, y preferiblemente comprenderá una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión

"cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o una sal, profármaco o solvato del mismo.

Por tanto, en otra realización preferida, la composición farmacéutica además comprende otro principio activo. Más preferiblemente, el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: un derivado de pirimidina, un derivado del platino, raltitrexed, paclitaxel, doxorubicina, un derivado de camptotecina, o cualquiera de sus combinaciones.

Los "análogos de pirimidinas" constituyen un grupo bien definido en el código ATC o Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (instituido por la Organización Mundial de la Salud, y adoptado en Europa). Pertenecen a la sección ATC L01, sección del sistema de clasificación ATC dentro del grupo L, correspondiente a los agentes antineoplásicos e inmunomoduladores. En concreto se clasifican como L01BC Análogos de las pirimidinas, y en la última actualización de 2011 incluye: L01BC01 citarabina; L01BC02 fluoruracilo; L01BC03 tegafur; L01BC04 carmofur; L01BC05 gemcitabina; L01BC06 capecitabina; L01BC07 azacitidina; L01BC08 decitabina; L01BC52 fluoracilo, combinaciones; L01BC53 tegafur, combinaciones.

En otra realización más preferida, el derivado de pirimidina se seleccionan de la lista que consiste en citarabina, fluoruracilo (5-fluoruracilo ó 5-FU), tegafur, carmofur, gemcitabina, capecitabina, azacitidina, decitabina, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones. En una realización particular de la invención, el análogo de pirimidina es el 5-fluorouracilo (5-FU), o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

En otra realización más preferida, el derivado de platino se seleccionan de la lista que consiste en carboplatino, cisplatino y oxiplatino, o cualquiera de sus sales, isómeros,

profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones. En una realización particular de la invención, el análogo de pirimidina es el oxiplatino o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

La 20- (S) -Camptotecina (CPT) , con nomenclatura IUPAC: (S) -4-Etil-4-hidroxi-1H-pirano[3', 4':6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolina-3, 14 (4H, 12H) -diona) , y sus derivados sintéticos, se encuentran entre los agentes antitumorales más prometedores que actualmente se conocen.

La CPT es un alcaloide fitotóxico aislado por primera vez de los extractos de una planta ornamental de origen chino, como se describe en *Wall et al., J. Am. Chem. Soc., vol. 88 (16) , pp. 3888-3890, (1966)* . A principios de los años 70, los estudios iniciales, centrados en el mecanismo de acción de la CPT, determinaron que la actividad citotóxica del alcaloide podría producirse debido a la capacidad de inhibir la síntesis de ADN y ARN. Se observó que dicha inhibición se producía de forma reversible, pero aumentando la concentración y el tiempo de exposición de la CPT el bloqueo de las secuencias se volvía irreversible. Las conclusiones generales determinaron que la CPT es selectiva en la fase S del ciclo celular, detiene la fase G_2 e induce la fragmentación del ADN cromosomal.

La CPT presenta una estructura pentacíclica con un centro asimétrico en el anillo E y una configuración 20 (S). La molécula está formada por un núcleo de quinolina (anillos Ay B) unido a un anillo de piridona (anillo D) y con un anillo de lactona de 6 átomos de carbono (anillo E) que presenta un grupo hidroxilo de configuración S.

En otra realización más preferida, el derivado de camptotecina se selecciona de la lista que consiste en topotecán, iridotecán o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y su combinación.

Los derivados del platino forman enlaces covalentes con la guanina y adenina del ADN. La mayoría de estas uniones son intracatenarias, aunque también pueden ser intercatenarias. Los fármacos más importantes de este grupo son: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Se utilizan para el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, tumores germinales, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de estómago, etc. El oxaliplatino es un análogo de tercera generación del cisplatino. Su mecanismo de acción es similar al de éste, pero además se une a proteínas nucleares y citoplasmáticas. Su principal indicación es el tratamiento del cáncer colorrectal.

Por tanto, en otra realización preferida el derivado de platino se selecciona de entre cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y su combinación. Aün más preferiblemente, el

derivado del platino es el oxaliplatino o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende el compuesto de la invención o la composición de la invención.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

En otra realización preferida de la presente invención, las composiciones y formas farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio. Otras formas farmacéuticas pueden ser los sistemas coloidales, dentro de los cuales se incluyen nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas poliméricas.

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Las composiciones y formas farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, mejora, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

La administración de los compuestos, composiciones o formas farmacéuticas de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, tópica o parenteral. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.001 y 1000 mg/Kg/día, o entre 0.1 y 500 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

COMPOSICIÓN ALIMENTARIA

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una composición alimentaria tal y como una composición nutracéutica o una composición del tipo "*medical food*", de ahora en adelante composición alimentaria de la invención, que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula (I).

En una realización preferida de este aspecto, la composición alimentaria o nutracéutica de la invención comprende como único principio activo un compuesto de la invención, o un tautómero, una sal farmacéuticamente aceptable, un derivado o un profármaco del mismo, aunque puede comprender adicionalmente otros excipientes y/o vehículos nutracéuticamente aceptables.

La composición alimentaria de la invención comprende el compuesto de la invención en una cantidad eficaz para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento cáncer, y preferiblemente

para la prevención, alivio y tratamiento del cáncer de colon, en mamíferos, incluyendo un ser humano. Las composiciones alimentarias preferidas se seleccionan de la lista que consiste en: una bebida, leche, yogur, queso, leche fermentada , bebida de leche aromatizada, leche de soja, cereales precocinados, pan, pasteles, mantequilla, margarina, salsas, aceites para freír, aceites vegetales, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, condimentos, aderezos para ensaladas, zumos de frutas, jarabes, postres, glaseados y rellenos, productos congelados blandos, dulces, chicles y alimentos intermedios. La composición alimentaria de la invención puede ser un suplemento nutricional o dietético. En otra realización preferida, el suplemento nutricional o dietético comprende una composición estéril que contiene el compuesto de la invención, preferentemente provisto de un revestimiento resistente a los ácidos gástricos, siendo una composición de liberación retardada. En otra realización preferida, la composición alimentaria, incluyendo el compuesto de la invención y/o el suplemento nutricional o dietético comprende "portadores" apropiados tales como diluyentes, adyuvantes, excipientes o vehículos con los que se administra el compuesto de la invención. Excipientes apropiados adecuados incluyen, pero no se limitan a almidón, glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, sulfato de calcio, gel de sílice , estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, y similares. Tales suplementos nutricionales se pueden utilizar para combatir problemas hepáticos, y ayudan a mantener la salud o un estilo de vida saludable al mamífero, preferiblemente un ser humano.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención para la prevención, alivio o tratamiento del cáncer, preferiblemente el cáncer de colon en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos. Alternativamente, se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención, para la prevención alivio y/o tratamiento del cáncer, preferiblemente del cáncer de colon en mamíferos, y más preferiblemente en seres humanos.

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto(preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

(i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;

(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;

(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto(preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la agomelatina, la composición de la invención o los componentes a) y/o b) de la preparación combinada de la invención tal y como se definen más abajo en la presente memoria.

De acuerdo con la presente invención, la forma farmacéutica es la disposición individualizada a que se adaptan los fármacos (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) para constituir un medicamento. Ejemplos de formas farmacéuticas líquidas pueden ser soluciones, (soluciones orales), aguas aromáticas, jarabes, elixires, colutorios, enjuagues bucales, pociones, mucílagos, emulsiones, suspensiones, colirios, lociones, tinturas, extractos fluidos, inyecciones, gargarismos, emplastos, pomadas, pastas, cremas, lociones, linimentos, geles, espumas, polvos, etc.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de la invención descritos anteriormente junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para su administración, los compuestos se combinan normalmente con uno o más adyuvantes apropiados para la ruta de administración indicada. Los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y / o alcohol polivinílico. Alternativamente los compuestos de esta invención se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulos, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y / o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente puede incluir material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

PREPARACIÓN COMBINADA DE LA INVENCIÓN

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende dos componentes:

a) Componente A: la agomelatina o una cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos farmacéuticamente aceptables, donde la agomelatina tiene la fórmula (I):

b) Componente B: otro principio activo que se selecciona de entre un derivado de pirimidina, un derivado del platino, raltitrexed, paclitaxel, doxorubicina, un derivado de camptotecina, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida, el derivado de pirimidina se seleccionan de la lista que consiste en citarabina, fluoracilo (5-fluoruracilo ó 5-FU), tegafur, carmofur, gemcitabina, capecitabina, azacitidina, decitabina, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones. En una realización particular de la invención, el análogo de pirimidina es el 5-fluorouracilo (5-FU), o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

En otra realización más preferida, el derivado de platino se seleccionan de la lista que consiste en carboplatino, cisplatino y oxiplatino, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones. En una realización particular de la invención, el análogo de pirimidina es el oxiplatino o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

En otra realización más preferida, el derivado de camptotecina se selecciona de la lista que consiste en topotecán, iridotecán o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y su combinación.

Los derivados del platino forman enlaces covalentes con la guanina y adenina del ADN. La mayoría de estas uniones son intracatenarias, aunque también pueden ser intercatenarias. Los fármacos más importantes de este grupo son: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Se utilizan para el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, tumores germinales, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de estómago, etc.

El oxaliplatino es un análogo de tercera generación del cisplatino. Su mecanismo de acción es similar al de éste, pero además se une a proteínas nucleares y citoplasmáticas. Su principal indicación es el tratamiento del cáncer colorrectal. Por tanto, en otra realización preferida el derivado de platino se selecciona de entre cisplatino, carboplatino y oxaliplatino,

o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y su combinación. Aün más preferiblemente, el derivado del platino es el oxaliplatino o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos.

Debe enfatizarse que el término “preparación combinada” o también denominada “yuxtaposición”, en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

Todos los compuestos de la presente invención (incluyendo por lo tanto cualquiera de los componentes a) o b) de la presente invención, anteriormente descritos, incluyen sales farmacéuticamente aceptables, esteres, amidas y profármacos, incluyendo pero no limitado a sales carboxílicas, sales de adición de amino ácidos, ésteres, amidas, y profármacos de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para su uso en pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, con una relación beneficio / riesgo razonable, y eficaces para su uso pretendido, así como las formas de ion híbrido (*zwitterionic forms*, en inglés), cuando sea posible, de los compuestos de la presente invención. El término “sales” hace referencia a las sales de adición de ácido relativamente inocuas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y purificación de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Ejemplos representativos de dichas sales incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato mesilato , glucoheptonato, lactobsonate, laurilsulfonato, y similares. Éstas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y amonio como, así como amonio inocuo, amonio cuaternario, y cationes de amina incluyendo, pero no limitado a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares (véase por ejemplo, Berge S.M, et al, "Pharmaceutical Salts,” *J.Pharm.Sci.,* 1977;66:1-19, el contenido del cual se incorpora en la presente solicitud por referencia).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los

expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares y reactivos

Para este estudio se han utilizado las líneas celulares establecidas de cáncer colorrectal HCT-116wt y HCT-116p53 -/- (Horizon Discovery Ltd.). Estas líneas celulares se han mantenido en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de antibióticos (pelicilina y estreptomicina). Todos los reactivos del cultivo celular fueron adquiridos de Gibco-BRL (Gibco; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células se cultivaron a 37ºC, en un ambiente humidificado y al 5% de CO2. Para los experimentos con diferentes tratamientos, las células se sembraron y al día siguiente se les cambió el medio, en este caso por un medio sin suero, durante 6 horas. Pasado este tiempo, el medio se cambió de nuevo por medio completo sin suero. De este modo, se asegura que se trabaja con cultivos sincronizados.

Los reactivos melatonina, agomelatina, 5-fluorouracilo, luzindol, fenfluramina y el resto de reactivos utilizados en este estudio se han obtenido de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co.).

Viabilidad celular.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4.000 células/pocillo, en un volumen final de incubación de 100 µl. Al día siguiente, las células se trataron según el protocolo correspondiente, de modo que el volumen final de incubación siempre fue de 100 µl. Acabado el tratamiento, se añadieron 10 µL de una disolución 5 mg/ml de MTT en PBS estéril y se incubaron 4 horas a 37ºC en atmósfera húmeda al 5% de CO2. Pasado este tiempo, se añadieron 100 µl de Tampón de Lisis (20% SDS en 50% formamida, pH = 4.7) y la placa se mantuvo a 37ºC en atmósfera húmeda al 5% de CO2 toda la noche. Posteriormente, se evaluó la absorbancia respecto al control a 570 nm en un lector de placas (Triad Multimode Reader, Cultek).

Ciclo celular

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, y tras los tratamientos adecuados, una población entre se recogieron con tripsina y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g. A

continuación se retiró el sobrenadante y se fijaron mediante la adición de 200 µl de etanol al 70%, agitando lentamente. Las células se dejaron reposar a -4ºC durante 30 minutos. A continuación, se lavaron en 2 ml de solución de PBS con un 2% de BSA. Posteriormente se resuspendieron en 0,5 ml de solución de PI/RNase, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se analizó el contenido mediante citometría de flujo (BDFACSAria II).

Actividad Fosfatasa Alcalina

La actividad fosfatasa alcalina se determinó utilizando un kit commercial (Sensolyte pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit, Anaspec, Fremont, CA, USA). Unas 10^5 células se lisaron en 50 µl de tampón al que se añadieron aprotinina 50 µg/ml, ide PMSF 1 mM, y leupeptina 50 µM, a 4°C durante 10 min. La absorbancia se midió a 405 (punto final) tras la adición de 50 µl de p-nitrofenil fosfato como sustrato de la reacción. La actividad se expresó en ng/ml $\cdot 10^6$ células.

Apoptosis

La proporción de células apoptóticas se determinó mediante un kit comercial (BD Lifesciences, UK). Brevemente, las células se lavaron con PBS frío, se tripsinizaron y se resuspedieron en solución tamponada a una concentración de 1 x 10^6 cells/ml. Unos 100 µl de la disolución (1 x 10^5 cells) se transfirieron a un tubo de 5 ml, al que se añadieron 5 µl de FITC Annexin V y 5 µl PI. Tras una agitación suave, las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) y en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 400 µl de solución tamponada y cada muestra celular se analizó antes de transcurrida una hora mediante citometría de flujo (BDFACSAria II).

Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4000 células/pocillo. Después del tratamiento, se eliminó el medio de cultivo y las muestras se incubaron con 100µl de DCFDA 100 µM durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadieron 50 µl de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) 3 mM e inmediatamente se midió la fluorescencia cada 5 minutos, durante media hora a las longitudes de onda λexc=485 nm y λem=530 nm.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total de las muestras, se preparó usando el rectivo TRIzol (Invitrogen). La cantidad de RNA total se determinó mediante espectrofotometría UV, y la integridad del misto

mediante electroforesis en gel de agarosa. El Cdna se preparó mediante RT-PCR con primers oligo-dT y partiendo de 2 µg de RNA total en 50 µl de volumen total utilizando un kit comercial (AccuScriptTM High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Stratagene).

PCR a tiempo real

Unos 5 µl de ADNc se amplificaron durante 40 ciclos con primers específicos para Per1, Per2, Per3, CLOCK y ubiquitina C (UBC) (Tabla 1). Las reacciones de PCR fueron amplificadas en un equipo de PCR a tiempo real (Mx3000P QPCR System, Stratagene). Los datos se recogieron como valores de Ct. La amplificación de UBC se utilizó como estándar interno de RNAm para normalizar las diferencias en concentración de muestra y carga. Se construyeron curvas de calibración para cada uno de los genes de estudio mediante el trazado de los valores de Ct frente a diluciones de cDNA conocidas. Después de cada experimento se realizó una electroforesis en gel de agarosa de cada muestra, para descartar los productos de PCR no específicos y los dímeros de primers.

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	PB
Per1	ttgatgtgatggcctgtgtggactgtggg (SEQ ID NO: 1)	gtgcagtttcctgctgtaggtaaggctgg (SEQ ID NO: 2)	276
Per2	ttcttccgttggaaccacccagacatctgc (SEQ ID NO: 3)	ccctggtccctttaagcctcatagtcttgg (SEQ ID NO: 4)	432
Per3	ggggactgcaaaagagaaaacgtccaggcg (SEQ ID NO: 5)	aaaaggtcgattttcctaatcattatcaggacgc (SEQ ID NO: 6)	422
CLOCK	ctatgaggtatgatgtgctgctgggaatgg (SEQ ID NO: 7)	aaaatcaaggcactatggggtttttttcccctg (SEQ ID NO: 8)	435
UBC	tgggatgcaaatcttcgtgaagaccctgac (SEQ ID NO: 9)	accaagtgcagagtggactctttctggatg (SEQ ID NO: 10)	213

Tabla 1. Primers utilizados en este estudio. **PB** indica Tamaño del Producto de la PCR

Western blotting

Las células se resuspendieron en 50 µl de tampón de lisis (tampón RIPA con inhibidores de fosfatasas y proteasas) por cada 500.000 células, durante 30 minutos a 4ºC. Los restos membranosos y de ADN se eliminaron por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificaron la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Una vez igualada la concentración a 50 µg para cada muestra, se añadió tampón de carga de proteínas (0.125 M Tris-HCL pH 6.8, β-mercaptoetanol 10%, Dodecil Sulfato Sódico 4%, Glicerol 20%, azul de bromofenol 0.004%) y las muestras se calentaron a 95ºC durante 3-5

minutos. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para separar las proteínas, que después se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) a 100 mA durante 45 minutos. Para disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada con una solución de leche en polvo al 5% en tampón TBS al 0.1% de Tween-20 durante 30 minutos y posteriormente incubada durante toda la noche a 4ºC con el anticuerpo correspondiente: caspasa 3 (1:3000, Immunostep) y β-actin (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Tras esta incubación, se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con tampón TBS/Tween 0.1%. Finalmente, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa HRP (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Posteriormente se procedió a un ciclo de tres lavados con tampón TBS/Tween 0.1%, y las bandas fueron visualizadas usando el programa Quantity One 4.6.8 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Xenógrafos tumorales en ratones inmunodeficientes

Para los estudios in vivo se utilizaron ratones hembras de la cepa balb/c athymic (nuþ/nuþ) de cuatro-seis semanas (Charles River Laboratories). Los animales se mantuvieron en cuarentena durante una semana antes de inyectarles subcutáneamente 2.5 x 10^6 células HCT-116wt y HCT-116p53-/-, en los flancos derecho e izquierdo respectivamente, resuspendidas en 100 µl de medio completo. Una vez que los tumores alcanzaron tamaños entre 100-150 mm^3, los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (8 animales por grupo). La melatonina (5 mg/kg), la agomelatina (5 mg/kg) y el 5-fluorouracilo (50 mg/kg) se prepararon en vehículo (etanol absoluto al 0.03% en suero salino) y se administraron mediante inyección intraperitoneal tres veces a la semana. El tamaño tumoral se evaluó dos veces a la semana y se calculó mediante la fórmula $(4\pi/3) \times (ancho/2)^2 \times (largo/2)$. Los animales se sacrificaron dos semanas después del comienzo de la inyección de los fármacos, y se extrajeron los tumores. También se extrajo sangre de cada uno de los animales para la determinación de parámetros bioquímicos (Glucosa, Urea, Acido Urico, AST, ALT, amilasa) en suero mediante un analizador Cobas c 311 (Roche Diagnostics, IN, USA)

Análisis Estadístico

Los datos se expresan como media±SEM. Para el análisis estadístico se ha utilizado la t de Student para datos no pareados. Valores de $P<0.05$ se han considerado significativos. Todo el análisis se ha realizado con el paquete estadístico SPSS software, versión 15.0 para Windows (SPSS Inc.).

RESULTADOS

Efecto de la melatonina y la agomelatina sobre la viabilidad celular en líneas establecidas de cáncer de colon en cultivo.

Para este estudio se han utilizado dos líneas tumorales establecidas de cáncer de colon con diferente status del gen p53, HCT-116 y HCT-116 p53 -/-, que se han cultivado en presencia de concentraciones crecientes de melatonina (0-1 mM) y agomelatina durante tres días. Mediante ensayo MTT se observa que ambos fármacos inhiben el crecimiento de estas células tumorales en cultivo (Figura 1).

En HCT-116 se observa efecto inhibidor por la melatonina a partir de 0.25 mM y a la máxima concentración (1 mM) la inhibición es cercana al 50%. En HCT-116 p53 -/-, sin embargo, aparece un efecto significativo a partir de 0.5 mM y a la máxima concentración de melatonina la inhibición llega a ser del 25.83%. Por lo tanto, las células que presentan el gen p53 no mutado mostraron mayor sensibilidad a la melatonina (Figura 1A). Existe, además, un efecto dosis-respuesta claro en ambas líneas celulares.

En el caso de la agomelatina (Figura 1B), el efecto inhibidor es mayor también en la línea celular HCT-116 p53 wt, aunque el efecto en ambas líneas celulares es significativamente mayor que el obtenido tras el tratamiento con melatonina.

Para determinar la implicación de los receptores MT1 y MT2 en los efectos obtenidos tras los tratamientos con melatonina y agomelatina, ambas líneas se cultivaron en presencia de Luzindol (10 µM), antagonista no selectivo de los dos receptores de membrana de la melatonina. En el caso de la línea HCT-116, no se observan diferencias en la capacidad inhibidora de melatonina y agomelatina tras la coincubación con luzindol (Figura 2A y 2B). De la misma forma, para determinar si la agomelatina actúa a través de los receptores 5-HT2C de la serotonina, las células se incubaron en presencia de agomelatina y Ro 60-0175 (10 nM), un agonista selectivo de estos receptores, aunque no se encontraron diferencias con respecto al efecto de la agomelatina sola (Figura 2C).

Distribución del ciclo celular tras los tratamientos con melatonina y agomelatina en líneas celulares de cáncer de colon en cultivo y diferenciación.

La distribución del ciclo celular tras los tratamientos con melatonina y agomelatina se ha evaluado mediante citometría de flujo (Figura 3). El tratamiento con melatonina 1 mM durante 72 horas induce la acumulación en fase G1 del ciclo en HCT-116 (87.50 ± 3.33% de

las células tratadas con melatonina en G1 frente a 68.53 ± 1.83% de las células control en la misma fase) y HCT-116 p53 -/- (80.50 ± 4.33% de las células tratadas con melatonina en G1 frente a 63.18 ± 1.76% de las células control en la misma fase). El tratamiento con melatonina también produjo un descenso del número de células en fase G2/M en HCT-116 (7.20 ± 0.84% en el grupo tratado con melatonina frente a 12.50 ± 0.13% en las células control) y HCT-116 p53 -/- (12.69 ± 1.21% en el grupo tratado con melatonina frente a 25.60 ± 1.42% en las células control). Otras concentraciones de melatonina no produjeron ninguna variación en la distribución del ciclo celular en ninguna de las dos líneas analizadas. Estos resultados indican que el tratamiento con melatonina 1 mM inhibe la progresión celular desde la fase G1 hacia la fase S, o lo que es lo mismo, provoca parada en la fase G1 (Figura 2A y 2B).

En cambio, el tratamiento con agomelatina 1 mM durante 72 horas induce la acumulación en fase G2/M del ciclo en HCT-116 (40.25 ± 1.91% de las células tratadas con melatonina en G2/M frente a 23.35 ± 1.42% de las células control en la misma fase) y HCT-116 p53 -/- (34.00 ± 1.13% de las células tratadas con melatonina en G2/M frente a 19.90 ± 1.42% de las células control en la misma fase). El tratamiento con melatonina también produjo un descenso del número de células en fase G1 en HCT-116 (39.36 ± 5.24% en el grupo tratado con melatonina frente a 69.47 ± 1.72% en las células control) y HCT-116 p53 -/- (46.40 ± 2.07% en el grupo tratado con melatonina frente a 73.00 ± 2.68% en las células control). Otras concentraciones de agomelatina produjeron variaciones similares en la distribución del ciclo celular en las dos líneas analizadas. Estos resultados indican que el tratamiento con agomelatina 1 mM inhibe la progresión celular desde la fase G1 hacia la fase S, o lo que es lo mismo, provoca parada en la fase G2/M (Figura 2C y 2D).

Una alteración en el ciclo celular que da lugar a parada en determinadas fases del mismo se ha asociado con diferenciación celular. En este estudio, aunque la melatonina induce parada de ciclo en la fase G1 en ambas líneas celulares, no induce un aumento de la actividad fosfatasa alcalina (Figura 4A). Es más, en la línea celular HCT-116 p53 -/- induce un descenso significativo de la misma a partir de 0.25 mM. Sin embargo, el tratamiento con agomelatina induce un aumento de la actividad de este enzima, aunque únicamente en la línea celular HCT-116 (Figura 4B).

La agomelatina induce apoptosis dependiente de caspasas en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 y HCT-116 p53 -/-.

Además de los efectos sobre el crecimiento cellular *in vitro* y el ciclo cellular, se ha estudiado si la melatonina y la agomelatina inducen muerte cellular por apoptosis utilizando anexina V y ioduro de propidio y analizando las poblaciones celulares teñidas por citometría de flujo.

El tratamiento con melatonina durante 72 horas no conlleva una apoptosis significativa en las dos líneas celulares analizadas a la dosis de 1 mM. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en el porcentaje de células apoptóticas en ambas líneas, que fue aproximadamente del 10% (Figura 5A). La agomelatina también induce apoptosis en ambas líneas celulares tras 72 horas de incubación. Se trata además de un efecto dosis-respuesta, de modo que el porcentaje de células apoptóticas aumenta a medida que aumenta la concentración del fármaco en ambas líneas celulares. Aunque se han encontrado diferencias en el número de células apoptóticas en las dos líneas, solamente son significativas a la dosis más baja de agomelatina (0.25 mM), siendo mayor en la línea HCT-116 (Figura 5B).

Para determinar la implicación de la activación de la cascada dependiente de caspasas en la respuesta apoptótica inducida por melatonina y agomelatina, se realizaron experimentos de western blot para caspasa 3 tras el tratamiento con ambos fármacos durante 72 horas. Como puede observarse en la figura 6, el tratamiento con agomelatina induce la activación de caspasa 3 en ambas líneas celulares, mientras que el tratamiento con melatonina no, debido probablemente al escaso porcentaje de apoptosis inducido por esta última. En el caso de la agomelatina, se produce activación de caspasa 3 incluso a la dosis de 0.25 mM en la línea celular HCT-116.

Regulación de los genes del reloj circadiano por melatonina y agomelatina en líneas de cáncer de colon in vitro.

Debido a la implicación de los genes del reloj circadiano en la aparición y el desarrollo del cáncer, y a que tanto la melatonina como la agomelatina son reguladores del ritmo circadiano a nivel central, hemos analizado si el tratamiento con ambos fármacos induce cambios en la expresión de Per1-3 en ambas líneas celulares. Para ello, las células se han incubado con melatonina y agomelatina durante 48 horas a la dosis de 1 mM. Para asegurarnos que se trata de cultivos sincronizados, antes del tratamiento, las células se mantuvieron en medio de cultivo sin suero durante 6 horas.

En la línea celular HCT-116, el tratamiento con melatonina aumenta la expresión de Per3 tras 24 horas de incubación y de Per1, Per2 y Per3 tras 48 horas (Figura 7A). En la línea celular HCT-116 p53 -/-, la melatonina aumentó la expresión de Per1 a las 48 horas (Figura 7B). En cambio, la agomelatina induce un aumento de la expresión de Per1, Per2 y Per3 a las 24h y a las 48 horas en la línea celular HCT-116 (Figura 7C), mientras que en la línea

celular HCT-116 p53 -/- induce un aumento de Per2 y Per3 a las 24 horas y de Per1, Per2 y Per3 a las 48 horas (Figura 7D).

Dado que uno de los reguladores más importantes de la expresión celular de los genes del reloj circadiano es el estado rédox celular, hemos analizado la capacidad antioxidante de las células tras el tratamiento con melatonina y agomelatina. En el caso de la melatonina, el tratamiento no cambia la capacidad antioxidante celular en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas (Figura 8A y 8B). La agomelatina por su parte no induce cambios en la capacidad antioxidante celular en la línea HCT-116, aunque los niveles iniciales de ROS/RNS disminuyen de forma dosis-respuesta (Figura 8C). Sin embargo, en la línea celular HCT-116 p53 -/-, el fármaco aumenta la capacidad antioxidante de la célula también de forma dependiente de la dosis (Figura 8D).

Efecto del tratamiento con agomelatina y melatonina sobre el crecimiento tumoral in vivo.

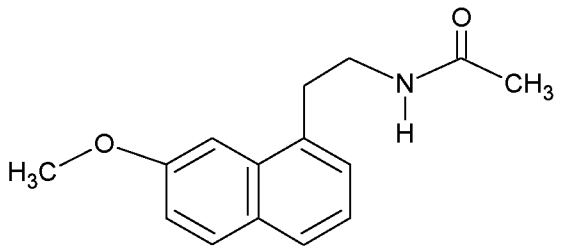
Para estudiar el efecto sobre el crecimiento tumoral in vivo y analizar los posibles efectos secundarios que pudiera ocasionar el tratamiento con ambos fármacos, las líneas celulares HCT-116 y HCT-116 p53 -/- se inyectaron en los flancos de ratones inmunodeprimidos de la cepa Balb/c nu/nu. La melatonina y la agomelatina se inyectaron a la dosis de 5 mg/Kg de peso tres veces a la semana. También se utilizó un grupo de animales a los que se le inyectó 5-fluorouracilo (5-FU) a la dosis de 50 mg/Kg de peso dos veces a la semana.

La melatonina y el 5-FU únicamente redujeron el tamaño tumoral en el caso de la línea celular HCT-116. En este caso, la agomelatina fue 2 veces más potente que la melatonina y 10 veces más potente que el 5-FU. Por el contrario, la agomelatina fue capaz de reducir el tamaño tumoral en el caso de la línea celular HCT-116 p53 -/-, aunque el efecto fue menor que en el caso de la línea HCT-116 (Figura 9).

A nivel sistémico, la melatonina y la agomelatina producen un aumento de la glucemia y la ALT, mientras que el tratamiento con 5-FU, induce un aumento de los niveles de ALT únicamente. Sin embargo, este último también induce un descenso del peso medio de los animales debido a que produce diarreas en los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer.

2. El uso del compuesto según la reivindicación 1, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

3. El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el cáncer es el cáncer de colon.

4. El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el cáncer es un cáncer con p53 no mutado.

5. El uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

6. El uso de una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se define en la reivindicación 1, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer.

7. El uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones

8. El uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, donde el cáncer es el cáncer de colon.

9. El uso de una composición farmacéutica según en cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el cáncer es un cáncer con p53 no mutado.

10. El uso de una composición farmacéutica según en cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

11. El uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde la composición además comprende otro principio activo.

12. El uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, donde el principio activo se selecciona de la lista que consiste en un derivado de pirimidina, un derivado del platino, raltitrexed, paclitaxel, doxorubicina, un derivado de camptotecina, o cualquiera de sus combinaciones.

13. El uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, donde el derivado de pirimidina es el 5-fluoruracilo, o cualquiera de sus sales, isómeros, solvatos, y sus combinaciones.

14. El uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6-13, donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Una composición alimentaria, nutracéutica o del tipo alimento médico (del inglés "*medical food*") que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1.

16. El uso de la composición alimentaria según la reivindicación anterior, para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer.

17. El uso de la composición alimentaria según la reivindicación 16, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

18. El uso de la composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, donde el cáncer es el cáncer de colon.

19. El uso de la composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde el cáncer es un cáncer con p53 no mutado.

20. El uso de la composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

21. Una preparación combinada que comprende:

    a. Un componente A: que se selecciona de entre un compuesto según se describe en la reivindicación 1, o una composición farmacéutica según se describe en la reivindicación 6, y
    b. Un componente B: que comprende un principio activo que se selecciona de la lista que consiste en un derivado de pirimidina, un derivado del platino, raltitrexed, paclitaxel, doxorubicina, un derivado de camptotecina, o cualquiera de sus combinaciones.

22. La preparación combinada según la reivindicación anterior, donde el derivado de pirimidina se selecciona de entre citarabina, fluoracilo (5-fluoracilo ó 5-FU), tegafur, carmofur, gemcitabina, capecitabina, azacitidina, decitabina, o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y sus combinaciones.

23. La preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 21-22, donde el derivado de pirimidina es el 5-fluoracilo.

24. La preparación combinada según la reivindicación 21, donde el derivado del platino se selecciona de entre carboplatino, cisplatino y oxiplatino.

25. La preparación combinada según la reivindicación anterior donde el derivado del platino es el oxiplatino.

26. La preparación combinada según la reivindicación 21, donde el derivado de camptotecina es el topotecán, el iridotecán o cualquiera de sus sales, isómeros, profármacos, derivados o análogos correspondientes, y su combinación.

27. El uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 21-26, en la elaboración de un medicamento para la prevención, mejora, alivio y/o tratamiento del cáncer.

28. El uso de la preparación combinada según la reivindicación 27, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cánceres del aparato digestivo (entre los que se encuentran, pero sin limitarse, el cáncer anal, esofágico, pancreático y gástrico (estómago)), cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de ovario y cuello uterino, y cáncer de piel de células basales y queratosis actínica, o cualquiera de sus combinaciones.

29. El uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 27-28, donde el cáncer es el cáncer de colon.

30. El uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 27-29, donde el cáncer es un cáncer con p53 no mutado.

31. El uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 27-29, donde el cáncer es un cáncer con p53 mutado.

Fig.1

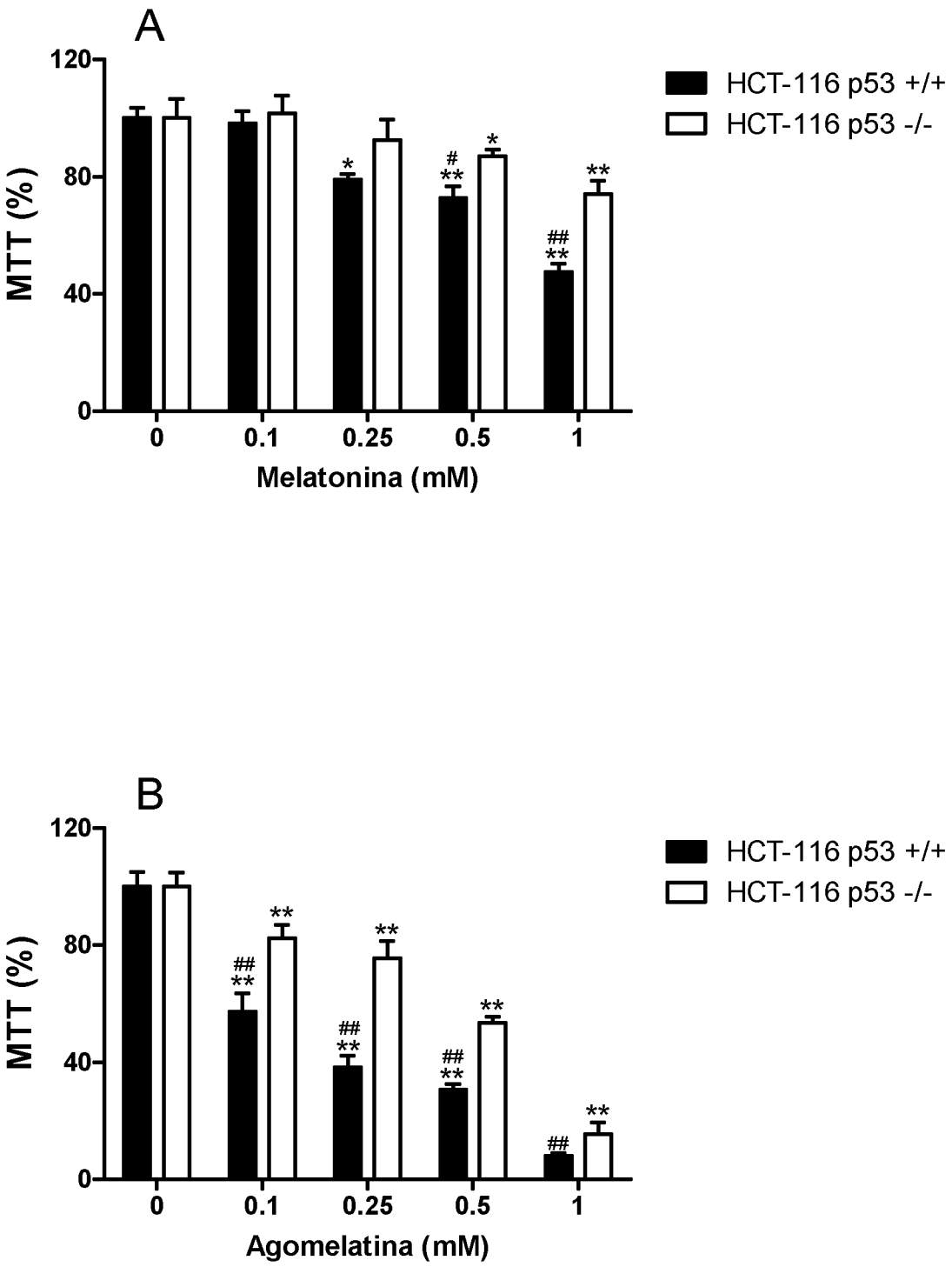

A
120
80
40
0
MTT (%)
0
0.1
0.25
0.5
1
Melatonina (mM)
HCT-116 p53 +/+
HCT-116 p53 -/-
B
120
80
40
0
MTT (%)
0
0.1
0.25
0.5
1
Agomelatina (mM)
HCT-116 p53 +/+
HCT-116 p53 -/-

Fig. 2

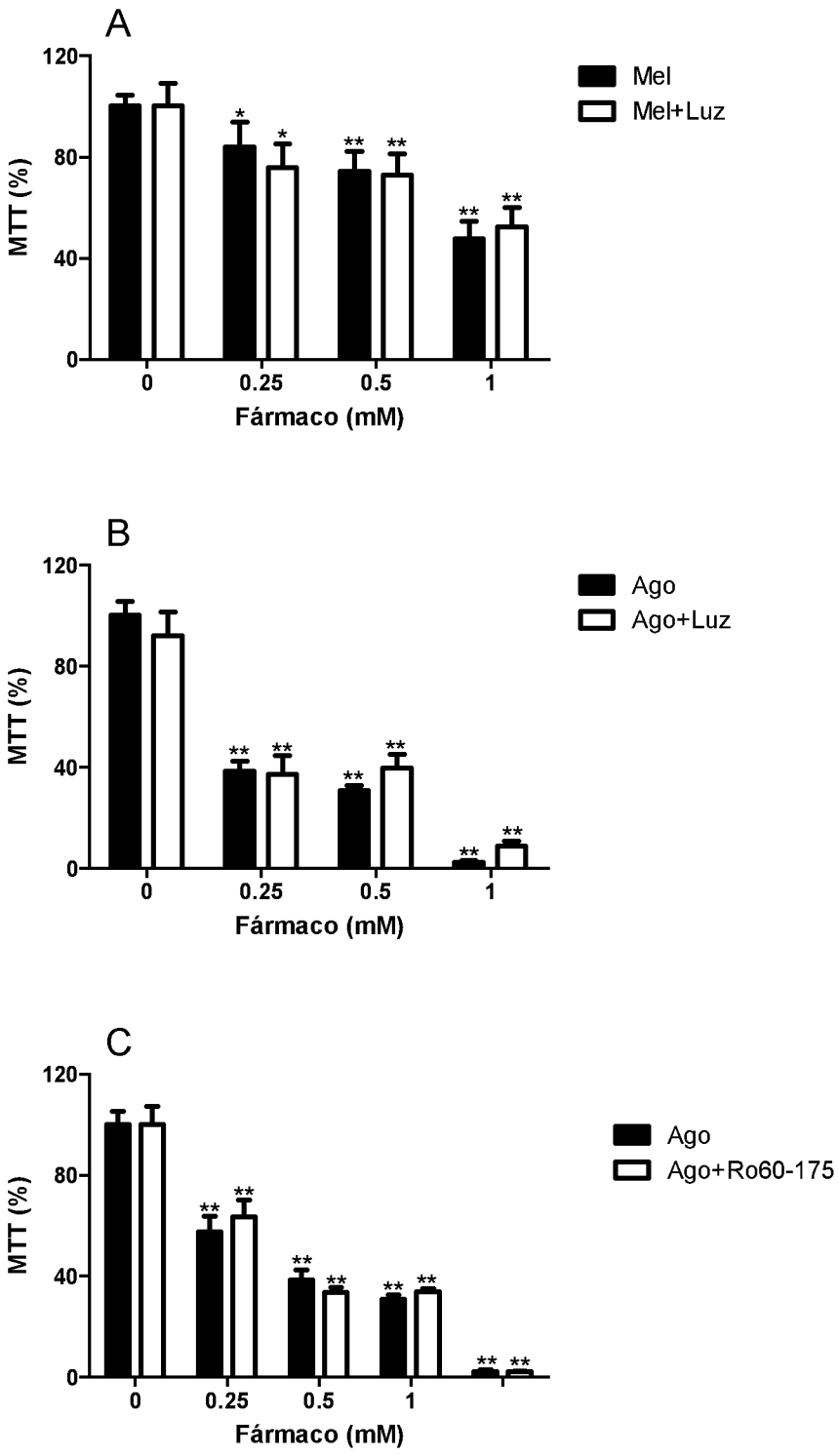

A
120
80
40
0
MTT (%)
0
0.25
0.5
1
Fármaco (mM)
Mel
Mel+Luz
B
120
80
40
0
MTT (%)
0
0.25
0.5
1
Fármaco (mM)
Ago
Ago+Luz
C
120
80
40
0
MTT (%)
0
0.25
0.5
1
Fármaco (mM)
Ago
Ago+Ro60-175

Fig. 3

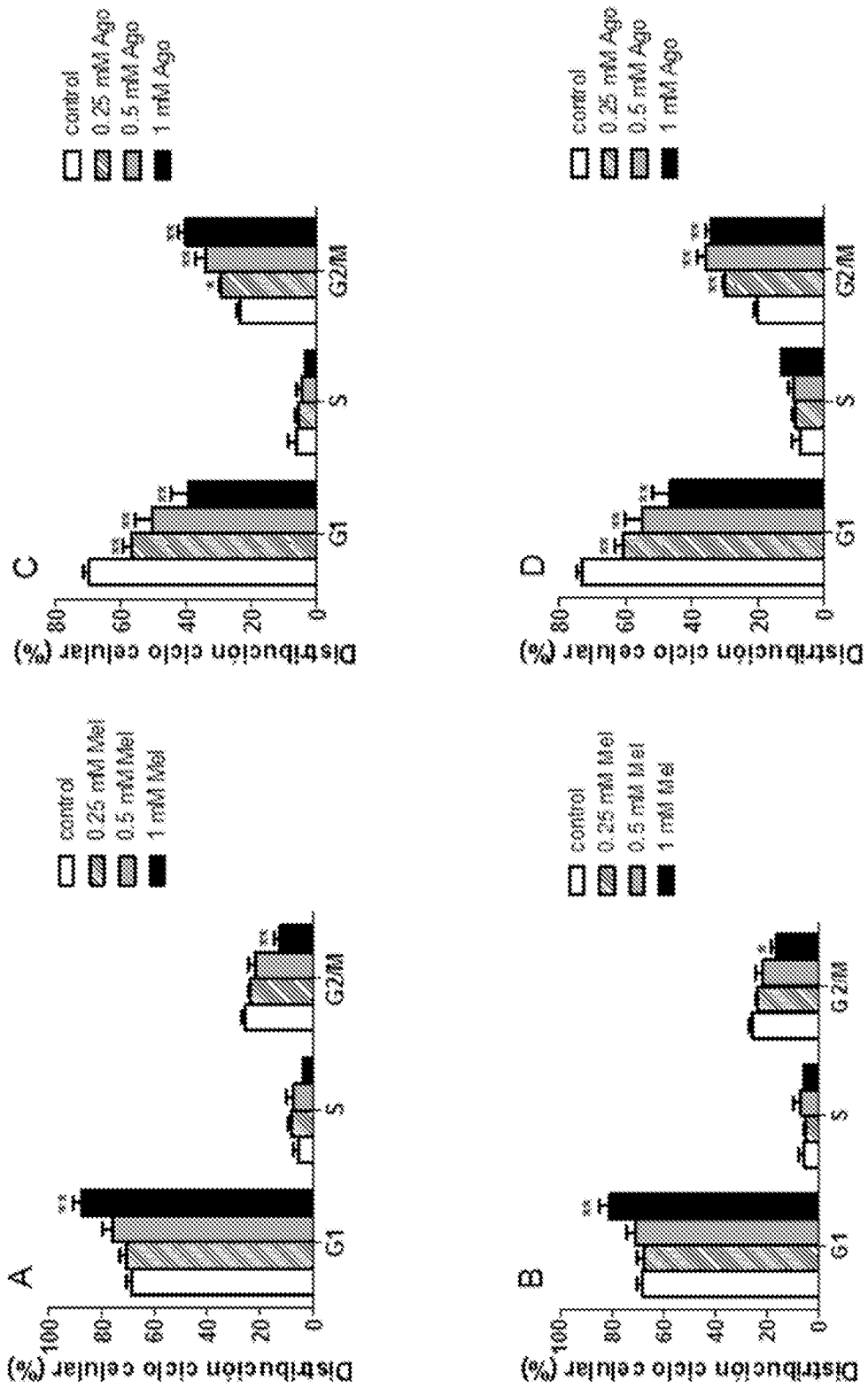

A
B
C
D
control
0.25 mM Mel
0.5 mM Mel
1 mM Mel
0.25 mM Ago
0.5 mM Ago
1 mM Ago
Distribución ciclo celular (%)
G1
S
G2/M

Fig. 4

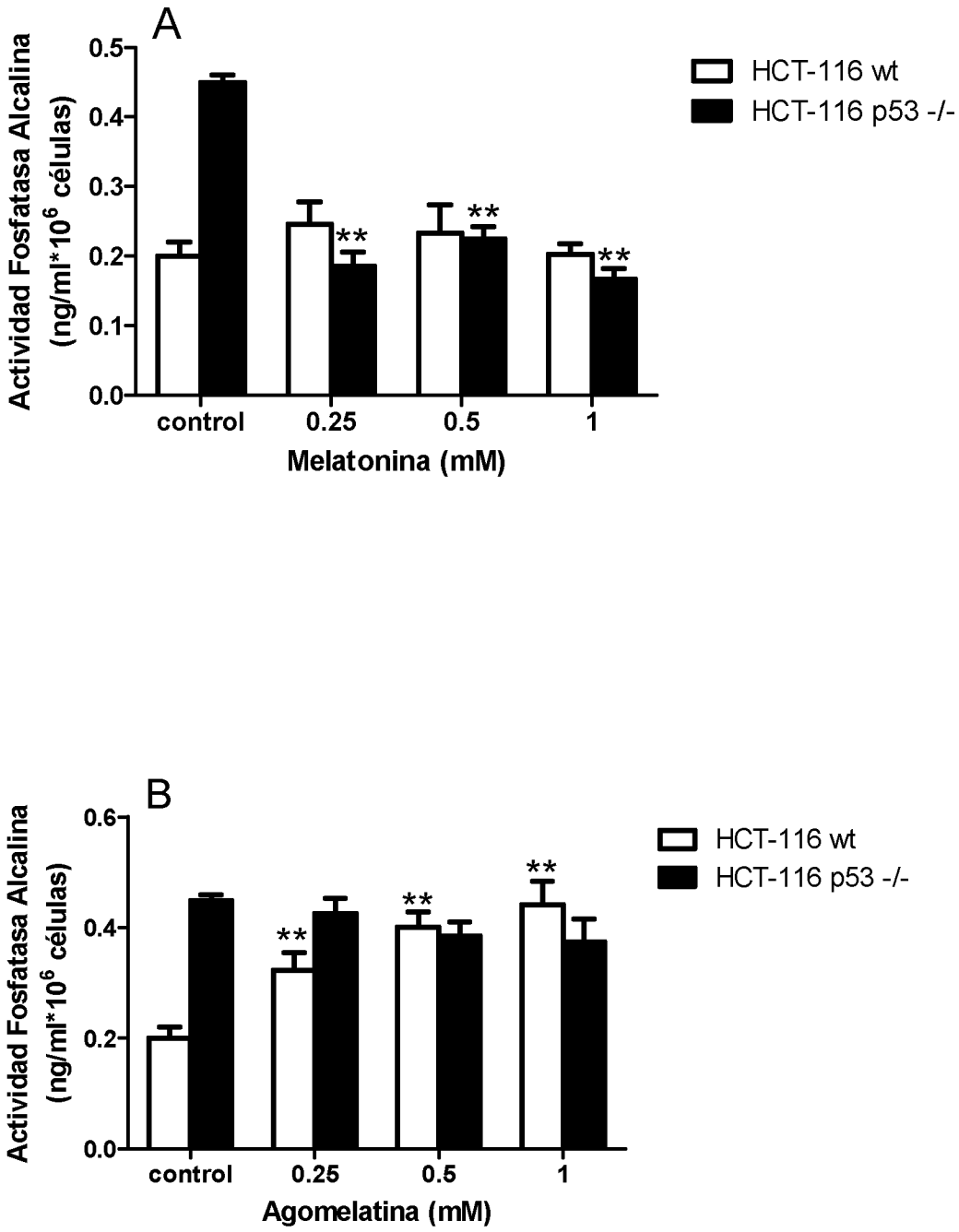
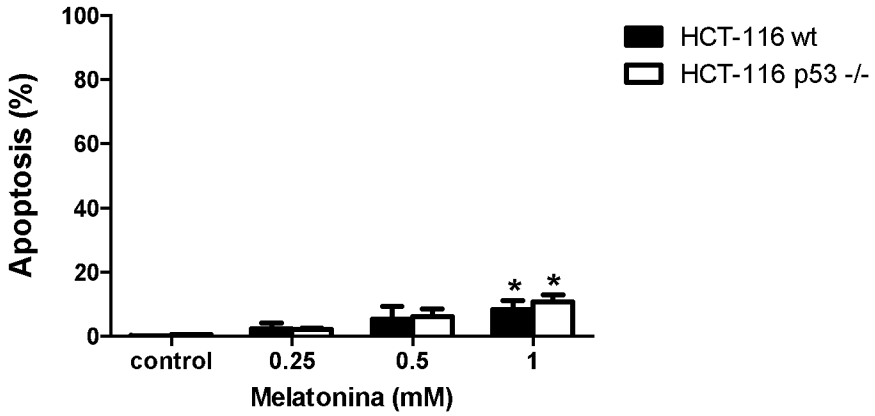

A
Actividad Fosfatasa Alcalina (ng/ml*10^6 células)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
**
**
control
0.25
0.5
1
Melatonina (mM)
HCT-116 wt
HCT-116 p53 -/-
B
Actividad Fosfatasa Alcalina (ng/ml*10^6 células)
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
**
control
0.25
0.5
1
Agomelatina (mM)
HCT-116 wt
HCT-116 p53 -/-

Fig. 5


100
80
60
40
20
0
Apoptosis (%)
HCT-116 wt
HCT-116 p53 -/-
*
*
control
0.25
0.5
1
Melatonina (mM)

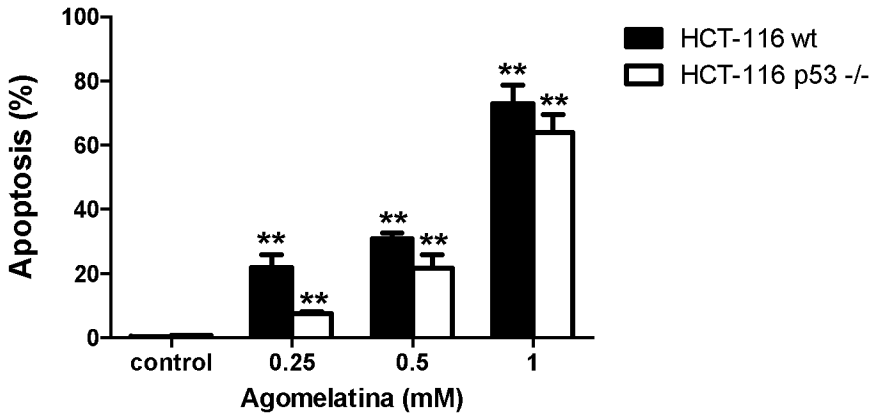

100
80
60
40
20
0
Apoptosis (%)
HCT-116 wt
HCT-116 p53 -/-
**
**
**
**
**
**
control
0.25
0.5
1
Agomelatina (mM)

Fig. 6

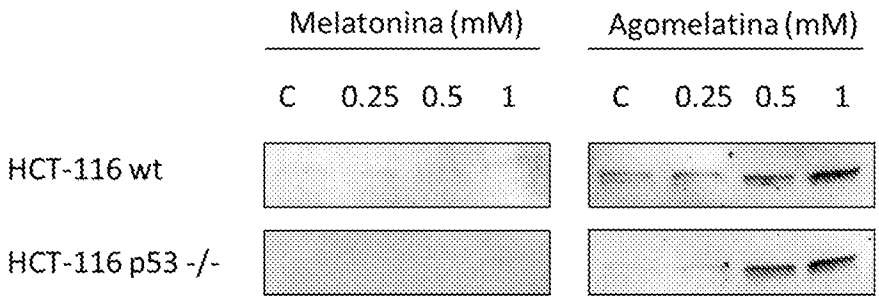

Melatonina (mM)
Agomelatina (mM)
C
0.25
0.5
1
C
0.25
0.5
1
HCT-116 wt
HCT-116 p53 -/-

Fig. 7

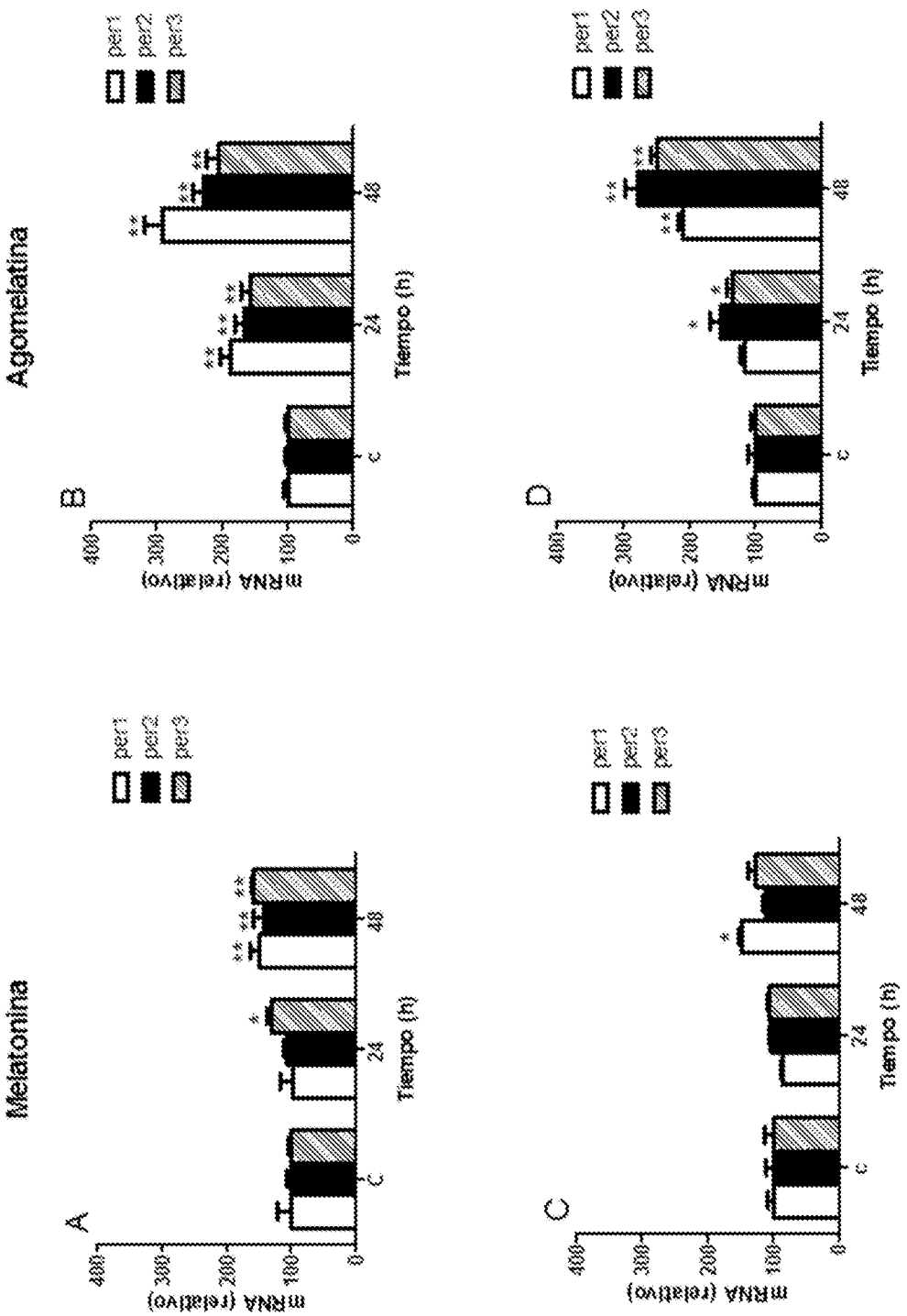

Melatonina
Agomelatina
per1
per2
per3
mRNA (relativo)
Tiempo (h)
A
B
C
D
c
24
48
0
100
200
300
400

Fig. 8

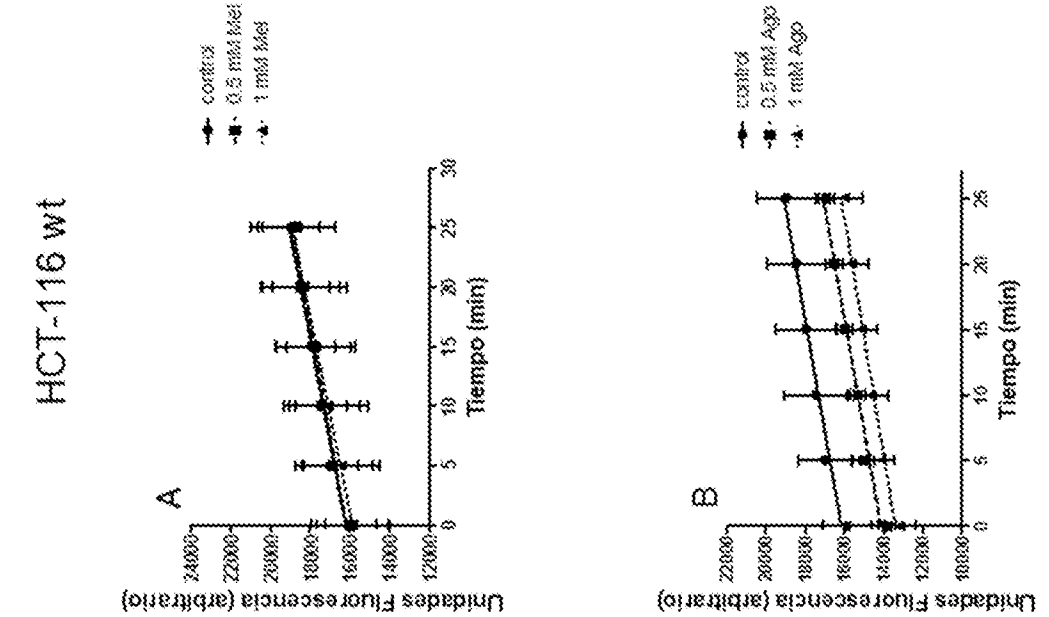

HCT-116 wt
HCT-116 p53 -/-
A
B
C
D
control
0.5 mM Met
1 mM Met
0.5 mM Ago
1 mM Ago
Unidades Fluorescencia (arbitrario)
Tiempo (min)

Fig 9.

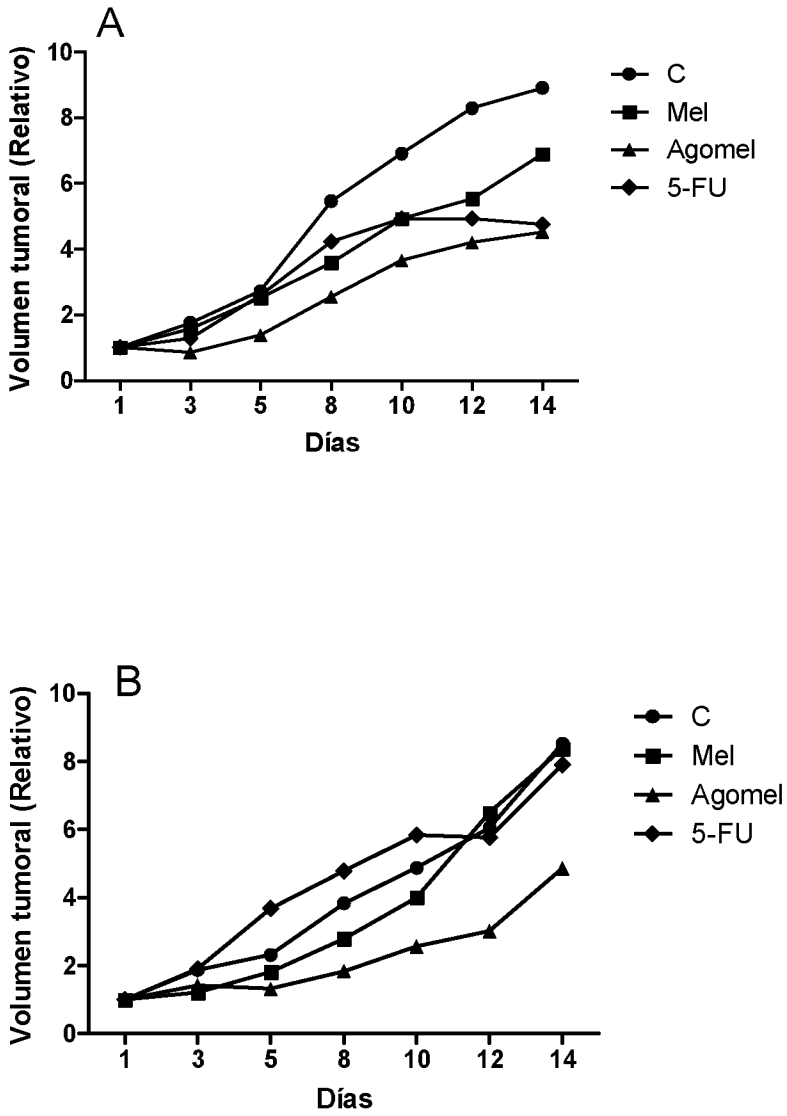
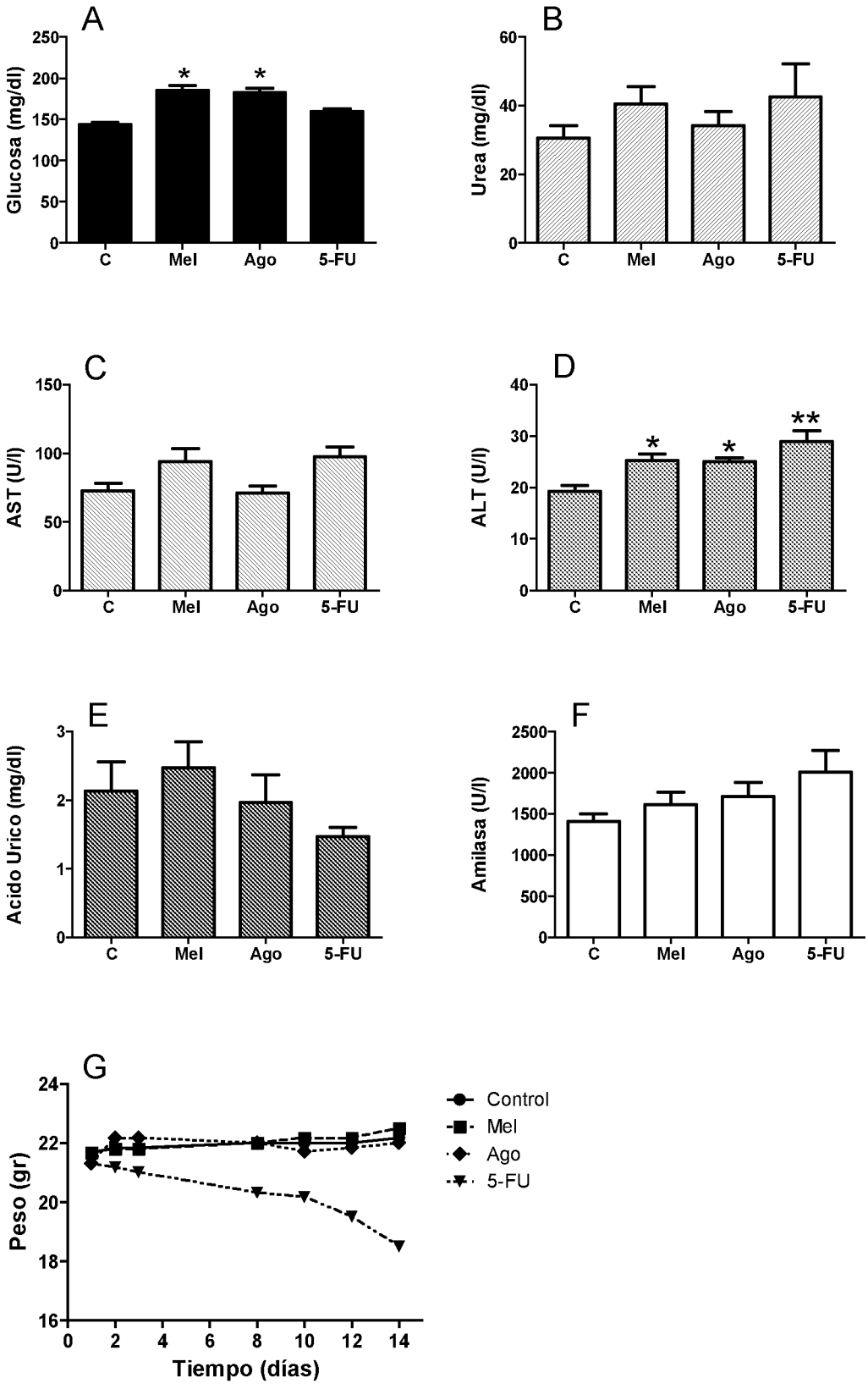

A
Volumen tumoral (Relativo)
0
2
4
6
8
10
1
3
5
8
10
12
14
Días
C
Mel
Agomel
5-FU
B
Volumen tumoral (Relativo)
0
2
4
6
8
10
1
3
5
8
10
12
14
Días
C
Mel
Agomel
5-FU

Fig. 10


A
Glucosa (mg/dl)
250
200
150
100
50
0
*
*
C
Mel
Ago
5-FU
B
Urea (mg/dl)
60
40
20
0
C
Mel
Ago
5-FU
C
AST (U/l)
150
100
50
0
C
Mel
Ago
5-FU
D
ALT (U/l)
40
30
20
10
0
*
*
**
C
Mel
Ago
5-FU
E
Acido Urico (mg/dl)
3
2
1
0
C
Mel
Ago
5-FU
F
Amilasa (U/l)
2500
2000
1500
1000
500
0
C
Mel
Ago
5-FU
G
Peso (gr)
24
22
20
18
16
0
2
4
6
8
10
12
14
Tiempo (días)
Control
Mel
Ago
5-FU

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070497

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/165 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013259800 A1 (PERSIDIS ANDREAS ET AL.) 03/10/2013, pages 11, 12, paragraphs 91-93, 101, 102, claims 15, 22 and 24	1, 2, 6, 7,11-17, 21-28
X	US 2007197829 A1 (SOUVIE JEAN-CLAUDE ET AL.) 23/08/2007, examples 4 and 5, page 5, paragraph 60	15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29/09/2016	**(04/10/2016)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer H. Aylagas Cancio Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2016/070497

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 16 - 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2016/070497

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2007197829 A1	23.08.2007	CY1108445T T1	09.04.2014
		MY138452 A	30.06.2009
		GEP20074133 B	25.06.2007
		CR7680 A	23.09.2008
		RS50662 B	30.06.2010
		HK1107081 A1	24.12.2010
		AU2010207746 A1	26.08.2010
		AU2010207746B B2	19.01.2012
		CU23515 A3	19.05.2010
		EA008473 B1	29.06.2007
		PT1564202E E	22.10.2008
		ES2314588T T3	16.03.2009
		ECSP055601 A	22.11.2005
		SI1564202T T1	31.12.2008
		HRP20080537T T3	31.12.2008
		DK1564202T T3	15.12.2008
		ZA200501257 B	01.09.2005
		UY28747 A1	31.10.2005
		US2008004352 A1	03.01.2008
		US7498466 B2	03.03.2009
		US2008004347 A1	03.01.2008
		US7498465 B2	03.03.2009
		US7544839 B2	09.06.2009
		US2005182276 A1	18.08.2005
		US7250531 B2	31.07.2007
		UA78825 C2	25.04.2007
		SG114703 A1	28.09.2005
		NZ538191 A	23.12.2005
		NO333500B B1	15.08.2005
		NO20050741 A	15.08.2005
		MXPA05001637 A	19.08.2005
		MA27518 A1	01.09.2005
		KR20060042943 A	15.05.2006
		KR100692776B B1	12.03.2007
		JP2005247844 A	15.09.2005
		JP4316517B B2	19.08.2009
		IL166815 A	29.04.2010
		HK1078563 A1	21.09.2007
		WO2005077887 A1	25.08.2005
		FR2866335 A1	19.08.2005
		FR2866335 B1	26.05.2006
		EP1564202 A1	17.08.2005
		EP1564202 B1	10.09.2008
		CN101041629 A	26.09.2007
		CN101041629B B	13.10.2010
		CN1680284 A	12.10.2005
		CN1321106C C	13.06.2007
		CA2495967 A1	13.08.2005
		CA2495967 C	22.01.2008
		BRPI0500393 A	27.09.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2016/070497

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		AU2005200616 A1	01.09.2005
		AU2005200616B B2	19.08.2010
		AT407921T T	15.09.2008
		AR047741 A1	15.02.2006
		AP1839 A	10.04.2008
US2013259800 A1	03.10.2013	WO2012082992 A1	21.06.2012

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2016/070497

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
A61K31/165 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	US 2013259800 A1 (PERSIDIS ANDREAS ET AL.) 03/10/2013, páginas 11, 12, párrafos 91-93, 101, 102, reivindicaciones 15, 22 y 24	1, 2, 6, 7,11-17, 21-28
X	US 2007197829 A1 (SOUVIE JEAN-CLAUDE ET AL.) 23/08/2007, ejemplos 4 y 5, página 5, párrafo 60	15

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29/09/2016	**04 de octubre de 2016 (04/10/2016)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado H. Aylagas Cancio Nº de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070497

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones **nos: 16-20**
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

Se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. La búsqueda se ha realizado considerando los posibles efectos de la composición.

2. ☐ Las reivindicaciones nos:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones nos:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nos:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nos:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070497

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2007197829 A1	23.08.2007	CY1108445T T1	09.04.2014
		MY138452 A	30.06.2009
		GEP20074133 B	25.06.2007
		CR7680 A	23.09.2008
		RS50662 B	30.06.2010
		HK1107081 A1	24.12.2010
		AU2010207746 A1	26.08.2010
		AU2010207746B B2	19.01.2012
		CU23515 A3	19.05.2010
		EA008473 B1	29.06.2007
		PT1564202E E	22.10.2008
		ES2314588T T3	16.03.2009
		ECSP055601 A	22.11.2005
		SI1564202T T1	31.12.2008
		HRP20080537T T3	31.12.2008
		DK1564202T T3	15.12.2008
		ZA200501257 B	01.09.2005
		UY28747 A1	31.10.2005
		US2008004352 A1	03.01.2008
		US7498466 B2	03.03.2009
		US2008004347 A1	03.01.2008
		US7498465 B2	03.03.2009
		US7544839 B2	09.06.2009
		US2005182276 A1	18.08.2005
		US7250531 B2	31.07.2007
		UA78825 C2	25.04.2007
		SG114703 A1	28.09.2005
		NZ538191 A	23.12.2005
		NO333500B B1	15.08.2005
		NO20050741 A	15.08.2005
		MXPA05001637 A	19.08.2005
		MA27518 A1	01.09.2005
		KR20060042943 A	15.05.2006
		KR100692776B B1	12.03.2007
		JP2005247844 A	15.09.2005
		JP4316517B B2	19.08.2009
		IL166815 A	29.04.2010
		HK1078563 A1	21.09.2007
		WO2005077887 A1	25.08.2005
		FR2866335 A1	19.08.2005
		FR2866335 B1	26.05.2006
		EP1564202 A1	17.08.2005
		EP1564202 B1	10.09.2008
		CN101041629 A	26.09.2007
		CN101041629B B	13.10.2010
		CN1680284 A	12.10.2005
		CN1321106C C	13.06.2007
		CA2495967 A1	13.08.2005
		CA2495967 C	22.01.2008
		BRPI0500393 A	27.09.2005

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070497

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		AU2005200616 A1	01.09.2005
		AU2005200616B B2	19.08.2010
		AT407921T T	15.09.2008
		AR047741 A1	15.02.2006
		AP1839 A	10.04.2008
US2013259800 A1	03.10.2013	WO2012082992 A1	21.06.2012