



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 987 670**

⑮ Int. Cl.:

A61K 31/27 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2011 PCT/US2011/029283**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11116399**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2011 E 11757135 (6)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 2547205**

④ Título: **Métodos novedosos para actuar sobre células madre cancerosas**

⑩ Prioridad:

**19.03.2010 US 315886 P
19.03.2010 US 315890 P
19.04.2010 US 325814 P**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2024

⑦ Titular/es:

**1GLOBE BIOMEDICAL CO., LTD. (100.0%)
8F, Block B, Techart Plaza, No. 30 Xueyuan Road,
Haidian District
Beijing 100083, CN**

⑦ Inventor/es:

**LI, CHIANG, JIA;
LEGGETT, DAVID;
LI, YOUNG y
LI, WEI**

⑦ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 987 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos novedosos para actuar sobre células madre cancerosas

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención se refiere a compuestos de naftofurano, compuestos de naftofurano en forma particulada, composiciones purificadas que contienen uno o más compuestos de naftofurano, composiciones purificadas que contienen uno o más compuestos de naftofurano en forma particulada, métodos para producir estos compuestos de naftofurano, 10 composiciones purificadas y/o formas particuladas, y métodos para utilizar estos compuestos de naftofurano, composiciones purificadas y/o formas particuladas para tratar a sujetos que lo necesiten.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15 Solo en los Estados Unidos las muertes por cáncer ascienden a cientos de miles cada año. A pesar de los avances en el tratamiento de ciertas formas de cáncer mediante cirugía, radioterapia y quimioterapia, muchos tipos de cáncer son esencialmente incurables. Incluso cuando se dispone de un tratamiento eficaz para un cáncer en particular, los efectos secundarios de tal tratamiento pueden ser graves y provocar una disminución significativa de la calidad de vida.

20 La mayoría de los agentes de quimioterapia convencionales tienen toxicidad y una eficacia limitada, particularmente en pacientes con tumores sólidos avanzados. Los agentes quimioterapéuticos provocan daños en las células no cancerosas, así como las cancerosas. El índice terapéutico de tales compuestos (una medida de la capacidad de la terapia para discriminar entre células cancerosas y normales) puede ser bastante bajo. Con frecuencia, una dosis de 25 un fármaco de quimioterapia que es eficaz para destruir las células cancerosas también destruirá las células normales, especialmente las células normales (tales como las células epiteliales) que se someten a una división celular frecuente. Cuando las células normales se ven afectadas por la terapia, pueden producirse efectos secundarios tales como pérdida de cabello, supresión de la hematopoyesis y náuseas. Dependiendo de la salud general de un paciente, tales efectos secundarios pueden impedir la administración de quimioterapia o, al menos, ser extremadamente desagradables e incómodos para el paciente y disminuir considerablemente la calidad de vida restante de los 30 pacientes con cáncer. Incluso en los pacientes con cáncer que responden a la quimioterapia con regresión tumoral, tal respuesta tumoral a menudo no va acompañada de una prolongación de la supervivencia sin progresión (SSP) o prolongación de la supervivencia general (SG). De hecho, el cáncer a menudo progresó rápidamente y forma más metástasis después de la respuesta inicial a la quimioterapia. Tales cánceres recidivantes se vuelven altamente resistentes o refractarios a los agentes quimioterapéuticos. Se considera que tal recidiva rápida y refractariedad, 35 después de la quimioterapia, están provocadas por las células madre cancerosas.

40 Estudios recientes han descubierto la presencia de células madre cancerosas (CMC, también denominadas células iniciadoras de tumores o células similares a las células madre cancerosas) que tienen capacidad de autorrenovación y se considera que son fundamentalmente responsables del crecimiento maligno, la recaída y las metástasis. Es importante destacar que las CMC son inherentemente resistentes a las terapias convencionales. Por lo tanto, un agente dirigido con actividad contra las células madre cancerosas supone una gran promesa para los pacientes con cáncer (*J Clin Oncol.* 10 de junio de 2008; 26(17)). Por lo tanto, las quimioterapias convencionales pueden destruir la mayor parte de las células cancerosas, pero dejar atrás las células madre cancerosas. Las células madre cancerosas 45 pueden crecer más rápido después de la reducción de las células cancerosas regulares que no son células madre mediante quimioterapia, que se considera el mecanismo para la recaída rápida después de las quimioterapias.

50 STAT3 es un oncogén que se activa como respuesta a citocinas y/o factores de crecimiento para fomentar la proliferación, la supervivencia y otros procesos biológicos. STAT3 se activa mediante la fosforilación de un residuo crítico de tirosina mediada por tirosina cinasas receptoras de factores de crecimiento, cinasas Janus o cinasas de la familia Src. Tras la fosforilación de la tirosina, STAT3 forma homodímeros y se traslada al núcleo, se une a elementos específicos de respuesta del ADN en los promotores del gen diana e induce la expresión génica. STAT3 activa los genes implicados en la tumorigénesis, invasión y metástasis, que incluyen Bclxl, Akt, c-Myc, ciclina D1, VEGF y survivina. STAT3 es anómalamente activo en una amplia variedad de cánceres humanos, que incluyen todos los carcinomas principales, así como algunos tumores hematológicos. Se encuentra STAT3 persistentemente activo en 55 más de la mitad de los cánceres de mama y pulmón, cánceres colorrectales, cánceres de ovario, carcinomas hepatocelulares y mielomas múltiples, etc.; y más de un 95 % de los cánceres de cabeza/cuello. Se considera que STAT3 es uno de los principales mecanismos de resistencia a los fármacos de las células cancerosas. Sin embargo, STAT3 ha resultado ser una diana difícil para el descubrimiento de un inhibidor farmacéutico. Hasta ahora, no se ha identificado ningún inhibidor directo de STAT3 con potencia clínicamente relevante después de décadas de esfuerzos 60 en la industria.

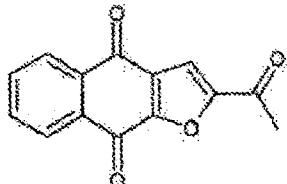
65 En consecuencia, existe la necesidad de descubrir compuestos y composiciones farmacéuticas para que actúen selectivamente sobre las células cancerosas, que actúen sobre las células madre cancerosas y que inhiban STAT3, y métodos para preparar estos compuestos y composiciones farmacéuticas para aplicaciones clínicas.

COMPENDIO

La invención se refiere a compuestos de naftofurano, composiciones purificadas que contienen uno o más compuestos de naftofurano, y compuestos de naftofurano en forma particulada. Estos compuestos de naftofurano (incluidos los que están en forma particulada) y las composiciones purificadas son inhibidores selectivos de las células madre cancerosas y STAT3. Los documentos WO 2009/036099 y WO 2009/036101 divulgan que los compuestos de naftofurano actúan sobre las células madre cancerosas. También inhiben las células cancerosas que no son células madre a través de la inhibición de STAT3. Estos compuestos son capaces de destruir muchos tipos diferentes de células cancerosas, sin provocar daños en las células normales en ciertas condiciones de exposición. Por lo tanto, los compuestos se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer, especialmente para el tratamiento y la prevención de cánceres refractarios, recidivantes, metastásicos o cánceres que expresan STAT3. Las publicaciones también describen los procesos para preparar los compuestos de naftofurano, derivados e intermedios de estos, y la composición farmacéutica de los compuestos pertinentes.

Estos compuestos de naftofurano (incluidos los que están en forma particulada), y las composiciones purificadas descritas en el presente documento son útiles en una variedad de indicaciones, que incluyen, por ejemplo, el tratamiento, el retraso de la progresión, la prevención de una recaída o el alivio de un síntoma de un trastorno de proliferación celular. Por ejemplo, los compuestos de naftofurano (incluidos los que están en forma particulada) y las composiciones purificadas son útiles en el tratamiento, el retraso de la progresión, la prevención de una recaída, el alivio de un síntoma o la mejora de otro modo de un cáncer.

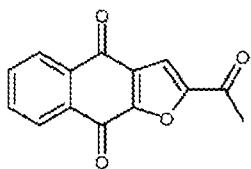
La presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:



o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en donde el método comprende la administración oral del compuesto con una dosis diaria total en el intervalo de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 1000 mg y en donde el compuesto está en forma particulada y las partículas tienen un valor de D_{50} superior o igual a aproximadamente 0,2 μm e inferior o igual a aproximadamente 20 μm , en donde el análisis del tamaño de partícula de las partículas se realiza utilizando un método de partículas secas.

En las reivindicaciones adjuntas se mencionan otros aspectos y realizaciones.

En algunos ejemplos de la divulgación, que se describen con fines de referencia únicamente, el compuesto de naftofurano es un polimorfo del compuesto que se muestra a continuación, al que se hace referencia en el presente documento como «Compuesto 1».



(1)

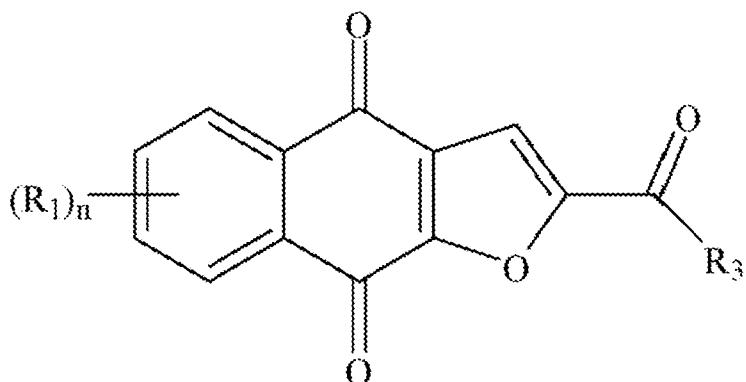
Por ejemplo, en algunos ejemplos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetyl-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar al que se expone en la Figura 1. El análisis de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura 1 se realizó utilizando un difractómetro PW1800 de Philips utilizando radiación de Cu a 40 KV/30 mA en el intervalo de 5° a 70° con un tamaño de paso de 0,03° y un tiempo de recuento de 3 horas. El análisis se realizó en 2-45° 2-theta utilizando las siguientes condiciones: rejilla de divergencia: 0,6 mm, rejilla antidespersión: 0,6 mm, rejilla de recepción: 0,1 mm, rejilla del detector: 0,6 mm, tamaño de paso: 0,02°, tiempo de paso: 5 segundos. En algunos ejemplos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetyl-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar al que se expone en la Figura 2. En algunos ejemplos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetyl-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar al que se expone en la Figura 3. El análisis de difracción de rayos X en polvo que se muestra en las Figuras 2 y 3 se realizó utilizando un difractómetro D8 Advance de Bruker. El análisis se realizó en 2-45° 2-theta utilizando las siguientes condiciones: rejilla de divergencia: 0,6 mm, rejilla antidespersión: 0,6 mm, rejilla de recepción: 0,1 mm, rejilla del detector: 0,6 mm, tamaño de paso: 0,02°, tiempo de paso: 5 segundos.

Por ejemplo, en algunos ejemplos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a aproximadamente 10,2, 11,4, 11,9, 14,1, 14,5, 17,3, 21,0, 22,2, 24,0, 26,0 y 28,1 grados 2 Θ . En algunos aspectos, 5 como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a aproximadamente 10,2, 11,9, 14,1, 14,5, 17,3, 22,2 y/o 28,1 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 10,2 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 11,9 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 14,1 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 14,5 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 17,3 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye dos o más picos de entre un pico al menos a 10,2 grados 2 Θ , un pico al menos a 11,9 grados 2 Θ , un pico al menos a 14,1 grados 2 Θ , un pico al menos a 14,5 grados 2 Θ , un pico al menos a 17,3 grados 2 Θ , un pico al menos a 22,2 grados 2 Θ y un pico al menos a 28,1 grados 2 Θ y cualesquiera combinaciones de estos. 15 20 25

Por ejemplo, en algunos ejemplos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a 30 aproximadamente 7,5, 9,9, 11,4, 12,3, 15,0, 23,0, 23,3, 24,1, 24,6, 25,0, 26,1, 27,0 y 28,4 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a 35 aproximadamente 7,5, 9,9, 12,3, 15, 23,0, 23,3, 24,6 y/o 28,4 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 40 aproximadamente 7,5 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 45 aproximadamente 9,9 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 50 aproximadamente 12,3 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 55 aproximadamente 15 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 23 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 23,3 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 24,6 grados 2 Θ . En algunos aspectos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a 28,4 grados 2 Θ . En algunos ejemplos, como referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye dos o más picos de entre un pico al menos a 7,5 grados 2 Θ , un pico al menos a 9,9 grados 2 Θ , un pico al menos a 12,3 grados 2 Θ , un pico al menos a 23,0 grados 2 Θ , un pico al menos a 23,3 grados 2 Θ , un pico al menos a 24,6 grados 2 Θ y un pico al menos a 28,4 grados 2 Θ y cualesquiera combinaciones de estos.

La presente invención también proporciona compuestos de naftofuranos en forma particulada. En los ejemplos descritos en el presente documento, el compuesto de naftofuranos en forma particulada es una partícula de un compuesto de Fórmula I que se muestra a continuación, que es activa, es decir, tiene eficacia y/o actividad antitumoral *in vivo*. La 60 partícula o las partículas eficaces tienen un requisito definido para el tamaño de la partícula, por ejemplo, tienen un diámetro inferior o igual a aproximadamente 20 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 2 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 0,5 μm o aproximadamente 0,2 μm . La partícula o las partículas que son más grandes que el tamaño de partícula definido son inactivas o menos activas.

En el presente documento también se divulga que, en algunos ejemplos y ejemplos de referencia, el compuesto de naftofurano en forma particulada es una partícula de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I o una sal o solvato de este,



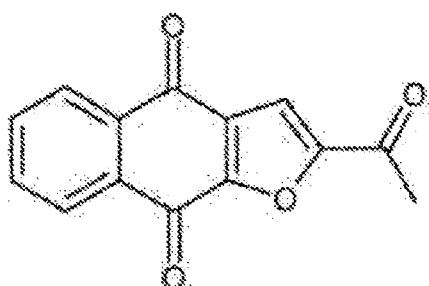
Fórmula I

5

en donde la partícula tiene un diámetro inferior o igual a aproximadamente 200 μm ; en donde cada (R_1) se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, flúor, ciano, nitrógeno, CF_3 , OCF_3 , alquilo, metilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, OR_a , SR_a y NH_2 ; en donde n es 4; en donde R_3 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, flúor, ciano, CF_3 , OCF_3 , alquilo, metilo, alquilo sustituido, alquilo sustituido con halógeno, alquilo sustituido con hidroxilo, alquilo sustituido con amino, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, OR_a , SR_a y NR_bR_c ; en donde R_a se selecciona/n independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo y arilo sustituido; y en donde R_b y R_c se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo y arilo sustituido, o R_b y R_c junto con el N al que están unidos forman un heterociclo o heterociclo sustituido. En la presente invención, el compuesto es 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, en donde R_1 es hidrógeno, n es 4 y R_3 es metilo.

En otros ejemplos descritos en el presente documento, como referencia, cada (R_1) se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, F (flúor), Cl, Br, I, OH y NH_2 ; R_3 se selecciona del grupo que consiste en metilo y $\text{C}(R_8)_3$, y cada (R_8) se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, F (flúor), Cl, Br, I, OH y NH_2 . En algunos ejemplos, únicamente como referencia, al menos dos de (R_1) y (R_8) son F (flúor), siendo el resto hidrógeno. Opcionalmente, R_3 es metilo. En otro ejemplo, como referencia, que se describe en el presente documento, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etylafto[2,3-b]furan-4,9-diona, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos.

En la presente invención, el compuesto de naftofurano en forma particulada es una partícula del Compuesto 1.



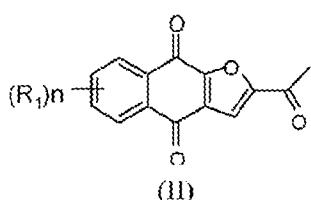
Compuesto (1).

35

En algunas realizaciones, la partícula tiene un diámetro inferior o igual a aproximadamente 20 μm . En una realización adicional, la partícula tiene un diámetro inferior o igual a aproximadamente 10 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 2 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 0,5 μm , aproximadamente 0,2 μm o aproximadamente 0,1 μm .

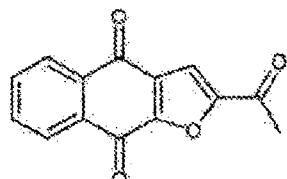
40

- En el presente documento se describe en general una partícula o partículas de un compuesto de naftofurano, por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, que son activas, es decir, tienen eficacia y/o actividad antitumoral. La partícula o las partículas activas tienen un tamaño determinado, por ejemplo, tienen un diámetro inferior o igual a aproximadamente 200 μm , aproximadamente 150 μm , aproximadamente 100 μm , aproximadamente 40 μm o 5
- 5 aproximadamente 20 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 4 μm , aproximadamente 3 μm , aproximadamente 2 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 0,5 μm , aproximadamente 0,2 μm o aproximadamente 0,1 μm . La partícula o las partículas que son más grandes que el tamaño determinado son inactivas o menos activas que las partículas descritas en el presente documento.
- 10 En algunos ejemplos descritos en el presente documento, una composición farmacéutica incluye partículas de un compuesto, por ejemplo, un naftofurano, de acuerdo con la Fórmula I o una sal o solvato de este. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica incluye partículas del Compuesto 1.
- 15 En las partículas de acuerdo con la reivindicación 1, una fracción del total acumulado de las partículas tiene un diámetro inferior o igual a aproximadamente 20 μm . La fracción es una fracción sustancial. Por ejemplo, una «fracción sustancial» de un conjunto de partículas puede ser al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 60 % o al menos aproximadamente un 50 % del número total de partículas en el conjunto.
- 20 Por ejemplo, la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 puede tener al menos aproximadamente un 90 % del total acumulado de las partículas que tienen un tamaño de partícula inferior o igual a aproximadamente 160 μm , 100 μm , 40 μm , 20 μm , 10 μm , 5 μm , 3 μm o 2 μm . La composición farmacéutica tiene al menos 25 aproximadamente un 50 % del total acumulado de las partículas que tienen un tamaño de partícula inferior o igual a aproximadamente 20 μm , 10 μm , 5 μm , 3 μm , 2 μm , 1 μm o 0,5 μm . Por ejemplo, la composición farmacéutica puede tener al menos aproximadamente un 10 % del total acumulado de las partículas que tienen un tamaño de partícula inferior o igual a aproximadamente 20 μm , 5 μm , 2 μm , 1 μm , 0,5 μm o 0,1 μm . En la composición farmacéutica, las partículas pueden tener un diámetro medio, por ejemplo, inferior o igual a aproximadamente 20 μm , 10 μm , 5 μm , 4 μm , 3 μm , 2 μm , 1 μm , 0,5 μm , 0,3 μm o 0,2 μm . Por ejemplo, las partículas pueden tener un diámetro medio de 30 aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 20 μm , o un diámetro medio de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 20 μm . Por ejemplo, la composición farmacéutica puede tener un total acumulado de partículas que tienen una relación de diámetro medio por encima del diámetro medio de como máximo aproximadamente 2 μm . La invención farmacéutica puede tener partículas que incluyen el compuesto en estado cristalino, en al menos dos estados polimorfos diferentes.
- 35 En algunos ejemplos descritos en el presente documento, la composición farmacéutica incluye un compuesto de Fórmula I en forma particulada, donde la partícula o las partículas son de menos de 20 micras, 10 micras, 5 micras, 2 micras, 1 micra o 0,5 micras.
- 40 La divulgación también se refiere en general a un compuesto sustancialmente puro de Fórmula II,



45 en donde cada R_1 es independientemente H, Cl o F; y n es 0, 1, 2, 3 o 4. En algunos ejemplos descritos en el presente documento, el compuesto de Fórmula II está en forma particulada.

En algunas realizaciones de la presente invención, el compuesto sustancialmente puro es el Compuesto 1



50 es decir, 2-acetylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, en donde el Compuesto 1 está en forma particulada.

En algunos ejemplos de referencia descritos en el presente documento, el compuesto sustancialmente puro se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafato[2,3-b]furan-4,9-

diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, éster mono[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico] del ácido fosfórico, éster dimetílico y éster 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos.

- 5 En algunas realizaciones, el compuesto, el producto y/o la composición farmacéutica tiene una pureza de al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 %. En algunas realizaciones, el compuesto, el producto y/o la composición farmacéutica tiene una pureza de al menos aproximadamente un 95,5 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 96,5 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 97,5 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 98,5 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 99,5 %. En algunas realizaciones, el compuesto, el producto y/o la composición farmacéutica tiene una pureza de al menos aproximadamente un 99,1 %, aproximadamente un 99,2 %, aproximadamente un 99,3 %, aproximadamente un 99,4 %, aproximadamente un 99,5 %, aproximadamente un 99,6 %, aproximadamente un 99,7 %, aproximadamente un 99,8 % o aproximadamente un 99,9 %.
- 10 15 En algunas realizaciones, el compuesto, el producto y/o la composición farmacéutica tiene impurezas de como máximo aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 0,15 % o aproximadamente un 0,5 %. En algunas realizaciones, el compuesto, el producto y/o la composición farmacéutica contiene, para cada impureza individual, como máximo aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,15 % o aproximadamente un 0,1 %. En una realización adicional, las impurezas son una o más del grupo que consiste en 2-acetil-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2,6-diacetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2,7-diacetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 3-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, nafto[2,3-b]furan-4,9-diol y 1-(4,9-dihidroxinafto[2,3-b]furan-2-il)etanona.
- 20 25 En algunas realizaciones, las impurezas incluyen un disolvente residual. En algunas realizaciones, el disolvente se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo (EtOAc), tolueno, etanol, metanol, cloroformo y CH₂Cl₂/hexano.
- 30 En algunas realizaciones, la pureza se determina con HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). En algunas realizaciones, la pureza se determina con RMN (resonancia magnética nuclear). En una realización adicional, la pureza se determina con HPLC y RMN.
- 35 40 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica, que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de naftofuran sustancialmente puro y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El excipiente puede incluir, por ejemplo, un éster de glicerol de un ácido graso, un éster de glicerol de un ácido graso saturado, un éster de glicerol de un ácido graso saturado que tiene de 8 a 18 carbonos, laurato de glicerilo, polietilenglicol, celulosa, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, una fosfatidilcolina, un lípido, un esterol, colesterol, un tensioactivo, un polisorbato y/o un alquilato de sorbitán polioxietileno.
- 45 50 Tal como se describe en el presente documento, un artículo de fabricación puede incluir un recipiente que contenga una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 Un método para producir un compuesto, producto y/o composición farmacéutica de acuerdo con algunas realizaciones de la invención puede incluir moler el compuesto para formar las partículas. Por ejemplo, el compuesto se puede moler con un molino de bolas, molino de rodillos, molino de chorro, se puede moler por vía húmeda, de forma ultrasónica, se puede triturar o tratar con una combinación de estos y/u otros procedimientos de molienda. La temperatura del compuesto se puede reducir, por ejemplo, se puede reducir hasta una temperatura criogénica, y se puede moler. Tal reducción de la temperatura puede hacer que el compuesto sea más quebradizo y más propenso a experimentar una reducción del tamaño de partícula al molerlo.
- 60 65 Un método para producir un compuesto, producto y/o composición farmacéutica de acuerdo con algunas realizaciones de la invención puede incluir una cristalización. La distribución del tamaño de partícula (DTP) obtenida durante la cristalización se ve influenciada por una combinación de varios mecanismos que ocurren durante la cristalización, tales como nucleación, crecimiento, agregación, desgaste, rotura, etc. Cuando el tamaño de partícula no se puede controlar de manera sistemática durante la cristalización para cumplir con las especificaciones deseadas, se puede incluir un paso de procesamiento adicional, tal como una molienda en seco.
- 70 La presente invención también se refiere a un compuesto, producto y/o composición farmacéutica para su uso en un método relacionado con la invención para el tratamiento, el retraso de la progresión, la prevención de una recaída, el alivio de un síntoma o la mejora de otro modo en un sujeto humano afectado por una neoplasia que puede incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, producto y/o composición farmacéutica, de modo que se produzca una actividad antineoplásica. Por ejemplo, la actividad antineoplásica puede ser una actividad anticancerosa. Por ejemplo, la actividad antineoplásica puede incluir retardar el crecimiento volumétrico de la neoplasia, detener el crecimiento volumétrico de la neoplasia o reducir el volumen de la neoplasia. La neoplasia puede incluir un tumor sólido, una neoplasia maligna, una célula metastásica, una célula madre cancerosa. La neoplasia puede incluir un carcinoma, un sarcoma, un adenocarcinoma, un linfoma o una neoplasia hematológica maligna. La neoplasia puede ser refractaria al tratamiento mediante quimioterapia, radioterapia y/o terapia hormonal. El

compuesto, producto y/o composición farmacéutica se pueden administrar para prevenir la recaída de la neoplasia. El compuesto, producto y/o composición farmacéutica se pueden administrar como terapia adyuvante a la resección quirúrgica. El compuesto, producto y/o composición farmacéutica se pueden administrar por vía oral. En el presente documento también se divulga un ejemplo, únicamente como referencia, en donde el compuesto, producto y/o composición farmacéutica se administran por vía intravenosa.

5 Un método relacionado con la invención también incluye el tratamiento, el retraso de la progresión, la prevención de una recaída, el alivio de un síntoma o la mejora de otro modo de una enfermedad o trastorno en un ser humano afectado por esa enfermedad o trastorno. En algunos ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, enfermedades inflamatorias intestinales, artritis, trastorno de desmielinización autoinmunitaria, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión e isquemia y esclerosis múltiple.

10 15 La administración de los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas a un paciente que padece una enfermedad o trastorno se considera exitosa si se consigue cualquiera de una variedad de resultados clínicos o de laboratorio. Por ejemplo, la administración se considera exitosa si uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno se alivia, se reduce, se inhibe o no progres a un estado posterior, es decir, peor. La administración se considera exitosa si el trastorno entra en remisión o no progres a un estado posterior, es decir, peor.

20 25 30 Los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento pueden administrarse en combinación con cualquiera de una variedad de terapias conocidas, que incluyen, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos y otros agentes antineoplásicos, compuestos antiinflamatorios y/o compuestos inmunosupresores. En algunas realizaciones, los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento son útiles en combinación con cualquiera de una variedad de tratamientos conocidos que incluyen, a modo de ejemplo no limitante, métodos y tratamientos quirúrgicos, radioterapia, quimioterapia y/u hormonas u otro tratamiento relacionado con el sistema endocrino.

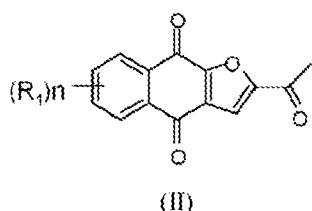
35 40 45 Estas «coterapias» se pueden administrar de manera secuencial o simultánea. Los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento y la segunda terapia se pueden administrar a un sujeto humano, en la misma composición farmacéutica. Como alternativa, los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento y la segunda terapia se pueden administrar de manera concurrente, por separado o de manera secuencial a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento y la segunda terapia se pueden administrar a un sujeto mediante las mismas vías de administración o mediante vías de administración diferentes. En algunas realizaciones, las coterapias de la invención comprenden una cantidad eficaz de los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento y una cantidad eficaz de al menos otra terapia (p. ej., agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente al de los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, las coterapias de la presente invención mejoran el efecto profiláctico o terapéutico de los compuestos, productos y/o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento y de la segunda terapia, al funcionar conjuntamente para tener un efecto aditivo o sinérgico. En ciertas realizaciones, las coterapias de la presente invención reducen los efectos secundarios asociados con la segunda terapia (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos).

50 55 60 65 En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno se puede tratar administrando el compuesto, producto y/o composición farmacéutica de la siguiente manera. La concentración molar en sangre del compuesto puede ser al menos una concentración eficaz e inferior a una concentración dañina durante un primer período de tiempo continuo que sea al menos tan largo como un período de tiempo eficaz y más corto que un período de tiempo dañino. La concentración molar en sangre puede ser inferior a la concentración eficaz después del primer período de tiempo continuo. Por ejemplo, la concentración eficaz puede ser de aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 0,2 μ M, aproximadamente 0,5 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 2 μ M, aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 4 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 6 μ M, aproximadamente 10 μ M u otra concentración que un experto en la técnica determine que es eficaz. Por ejemplo, la concentración dañina puede ser de aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 15 μ M, aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 100 μ M u otra concentración que un experto en la técnica determine que es dañina. Por ejemplo, el período de tiempo eficaz puede ser de aproximadamente 1 hora, 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas u otro período de tiempo que un experto en la técnica determine que es eficaz. Por ejemplo, el período de tiempo dañino puede ser de aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 144 horas u otro período de tiempo que un experto en la técnica determine que es dañino.

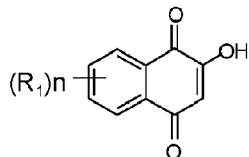
En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, producto y/o composición farmacéutica se selecciona para producir una concentración en sangre superior al valor de Cl_{50} de las células del tumor e inferior al valor de Cl_{50} de las células normales. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz se selecciona

para producir una concentración en sangre suficientemente elevada para destruir las células del tumor e inferior al valor de Cl_{50} de las células normales.

- 5 En algunas realizaciones, el compuesto, producto y/o composición farmacéutica se administran por vía oral en una forma farmacéutica, por ejemplo, un comprimido, pastilla, cápsula (dura o blanda), comprimido oblongo, polvo, gránulo, suspensión, solución, gel, sobre, pastilla para chupar, gragea, sirope, elixir, emulsión, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite y/o un jarabe.
- 10 En algunos ejemplos descritos en el presente documento, una composición para reducir o inhibir la replicación o propagación de células neoplásicas incluye un conjunto de partículas seleccionadas mediante el siguiente método. Se puede proporcionar el Compuesto 1 o una sal o solvato de este. Se puede preparar al menos un conjunto de partículas que incluyen el compuesto. Se puede determinar la distribución del tamaño de partícula de cada uno de dicho al menos un conjunto de partículas. Se puede administrar al menos un conjunto de partículas a las células neoplásicas y a las células normales con una concentración predeterminada y durante un período de tiempo predeterminado. Se puede observar el efecto de las partículas sobre el metabolismo y/o la división de las células neoplásicas y las células normales. Se puede asignar una clasificación de eficacia a cada conjunto de partículas en función del efecto de las partículas sobre las células neoplásicas. Se puede asignar una clasificación de toxicidad a cada conjunto de partículas en función del efecto de las partículas sobre las células normales. La clasificación de eficacia y/o la clasificación de toxicidad de dicho al menos un conjunto de partículas que tienen una primera distribución de tamaño de partícula se pueden comparar con la clasificación de eficacia y/o la clasificación de toxicidad de al menos otro conjunto de partículas que tienen una distribución de tamaño de partícula diferente de la primera distribución de tamaño de partícula. El conjunto de partículas que tienen una clasificación de eficacia superior, una clasificación de toxicidad inferior y/o una suma de clasificación de eficacia y clasificación de toxicidad ponderada superior a la de al menos otro conjunto de partículas se puede seleccionar como un conjunto óptimo. Por ejemplo, la distribución de tamaño de partícula del conjunto óptimo de partículas se puede identificar como una distribución óptima de tamaño de partícula. Por ejemplo, el conjunto óptimo de partículas se puede incluir en la composición. Por ejemplo, la clasificación de eficacia puede ser proporcional a la actividad antitumoral. Por ejemplo, la clasificación de eficacia se puede basar en la inhibición del metabolismo y/o la división de las células neoplásicas. Por ejemplo, la clasificación de toxicidad puede ser inversamente proporcional a la tolerabilidad. Por ejemplo, la clasificación de toxicidad se puede basar en la inhibición del metabolismo y/o la división de las células normales. Por ejemplo, dicho al menos un conjunto de partículas se puede administrar a las células neoplásicas y a las células normales *in vitro*. Por ejemplo, la clasificación de eficacia puede ser el valor de Cl_{50} de las células neoplásicas. Por ejemplo, la clasificación de toxicidad puede ser el valor de Cl_{50} de las células normales. Por ejemplo, dicho al menos un conjunto de partículas se puede administrar a las células neoplásicas y a las células normales *in vivo* en un animal de prueba. El animal de prueba puede ser, por ejemplo, un mamífero, primate, ratón, rata, cobaya, conejo o perro. La clasificación de eficacia puede ser la disminución en el volumen de las células neoplásicas, y la clasificación de toxicidad puede ser la disminución en la masa del animal de prueba.
- 40 La preparación de un conjunto de partículas que incluyen el compuesto puede incluir el aislamiento de las partículas con una distribución predeterminada de tamaño de partícula mediante la disolución y dispersión del compuesto, la disolución y dispersión del compuesto con una técnica microfluídica, la disolución y dispersión del compuesto con cavitación o nebulización, la molienda del compuesto, la molienda del compuesto con un molino de bolas, la molienda del compuesto con un molino de rodillos, la molienda del compuesto con un molino de chorro, la molienda del compuesto por vía húmeda, la molienda ultrasónica del compuesto, la trituración del compuesto y/o el tamizado del compuesto. Las partículas se pueden suspender en un excipiente farmacéuticamente aceptable. La determinación de la distribución de tamaño de partícula puede incluir el uso de una técnica seleccionada del grupo que consiste en el análisis por tamizado, el recuento microscópico óptico, el recuento de micrografías electrónicas, el recuento de la electrorresistencia, el tiempo de sedimentación, difracción láser, espectroscopía acústica y combinaciones de estas.
- 45 50 Un método para tratar una neoplasia u otro trastorno de proliferación celular puede incluir la administración a un ser humano, mamífero o animal afectado por una neoplasia de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que incluye un conjunto óptimo de partículas de la composición que tienen una distribución y tamaño de partícula óptimos.
- 55 En el presente documento también se describe un proceso para preparar un compuesto de Fórmula II,



en donde R_1 es H, Cl o F, incluyendo el proceso hacer reaccionar un compuesto de Fórmula III,

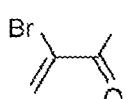


(III)

5 con una cetona en un primer disolvente en presencia de una base, cristalizar el producto crudo de la mezcla de reacción en reposo y hacer reaccionar el producto crudo con un agente oxidante en un segundo disolvente.

La reacción se puede llevar a cabo en un recipiente abierto en contacto con el aire.

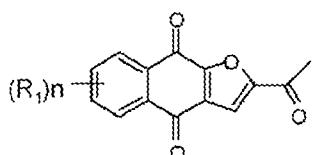
10 La cetona puede ser un compuesto de Fórmula IV.



(4-3)

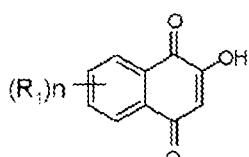
15 El primer disolvente se puede seleccionar del grupo que consiste en tetrahidrofurano (THF), dioxano y tolueno, y la base se selecciona del grupo que consiste en 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), trietilamina y diisopropiletilamina. El agente oxidante puede ser dióxido de manganeso. El segundo disolvente puede ser tolueno. El proceso puede incluir además tratar el producto de la oxidación con carbón vegetal.

En el presente documento también se describe un proceso para preparar un compuesto de Fórmula II,



(II)

20 en donde R1 es H, Cl o F, incluyendo el proceso hacer reaccionar un compuesto de Fórmula III,



(III)

25 con una cetona en un primer disolvente en presencia de una base, cristalizar el producto crudo de la mezcla de reacción en reposo, disolver el producto crudo en un segundo disolvente y tratar el producto crudo con carbón vegetal.

30 En el presente documento también se describe un proceso para preparar un compuesto de naftofuran. El proceso incluye hacer reaccionar un compuesto de naftodihidrofurano o una mezcla que incluye el compuesto de naftodihidrofurano con un agente oxidante en un primer disolvente. La mezcla puede incluir además un compuesto de naftofuran.

35 El compuesto de naftofuran se puede seleccionar del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, éster mono[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico] del ácido fosfórico, éster dimetílico y éster 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos. El agente oxidante puede ser dióxido de manganeso. El primer disolvente puede ser tolueno. El proceso puede incluir además filtrar el producto de oxidación a través de un lecho de carbón activado. El proceso puede incluir además cristalizar el compuesto de naftofuran evaporando el primer disolvente. El proceso puede incluir además recristalizar el compuesto de naftofuran con un segundo disolvente. El segundo disolvente puede ser acetato

de etilo. El proceso puede incluir además suspender el compuesto de naftofurano con un segundo disolvente, calentar la suspensión y enfriar la suspensión.

En el presente documento también se proporciona un proceso para preparar un compuesto de naftofurano sustancialmente puro. El proceso incluye cristalizar un compuesto de naftofurano con un primer disolvente y recristalizar el compuesto de naftofurano con un segundo disolvente. En el presente documento también se proporciona otro proceso para preparar un compuesto de naftofurano sustancialmente puro. El proceso incluye cristalizar un compuesto de naftofurano con un primer disolvente, suspender el compuesto de naftofurano cristalino con un segundo disolvente, calentar la suspensión y enfriar la suspensión. El compuesto de naftofurano se puede seleccionar del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetyl-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetyl-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, éster mono[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico] del ácido fosfórico, éster dimetílico y éster 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos. El primer disolvente puede ser tolueno. El segundo disolvente puede ser acetato de etilo.

En el presente documento también se describe un compuesto de naftofurano preparado mediante uno cualquiera de los procesos anteriores. El compuesto de naftofurano se puede seleccionar del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetyl-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetyl-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, éster mono[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico] del ácido fosfórico, éster dimetílico y éster 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos. El compuesto de naftofurano puede tener una pureza de al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 % o aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 %. El compuesto de naftofurano puede tener impurezas de como máximo aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,15 % o aproximadamente un 0,1 %.

En el presente documento también se describen métodos para preparar partículas del Compuesto 1, que incluyen partículas de un polimorfo del Compuesto 1, partículas de formas altamente puras del Compuesto 1 y partículas de formas altamente puras de un polimorfo del Compuesto 1. Las partículas que tienen un tamaño medio de partícula deseado, por ejemplo, aproximadamente 20 micras, se pueden producir moliendo cristales del Compuesto 1, que incluyen cristales de una forma purificada del Compuesto 1, cristales de un polimorfo del Compuesto 1 y/o cristales de una forma purificada de un polimorfo del Compuesto 1. Por ejemplo, los cristales se muelen utilizando un método de molienda por chorro donde la presión de Venturi es de aproximadamente 40, la presión de la molienda es de aproximadamente 100 y la tasa de alimentación es de aproximadamente 1304 g/hora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1 es una ilustración que representa los datos de DRXP de la Forma cristalina 1.
- La Figura 2 es una ilustración que representa los datos de DRXP de la Forma cristalina 2.
- La Figura 3 es una ilustración que representa los datos de DRXP de la Forma cristalina 3.
- La Figura 4 es una ilustración que representa la comparación de los datos de DRXP de la Forma cristalina 1 y la Forma cristalina 3.
- Las Figuras 5A y 5B son una serie de ilustraciones que representan el proceso sintético para la Forma cristalina 2.
- Las Figuras 6A-6D son una serie de ilustraciones que representan el proceso sintético para la Forma cristalina 3.
- Las Figuras 7A y 7B son fotografías que representan la morfología de las Formas cristalinas 1 y 3.
- La Figura 8 es una gráfica que representa la actividad antitumoral limitada de la Forma cristalina 1.
- La Figura 9 es una gráfica que representa la actividad antitumoral de la Forma cristalina 2.
- La Figura 10 es una gráfica que representa la comparación de la actividad antitumoral de la Forma cristalina 1 y la Forma cristalina 3.
- La Figura 11 es una gráfica que representa los datos farmacocinéticos (PK) clínicos en pacientes con cáncer para la Forma cristalina 2.

- La Figura 12 es una gráfica que representa los datos PK clínicos de la Forma cristalina 3 en pacientes con cáncer.
- 5 La Figura 13 es una gráfica que representa la toxicidad observada con una Forma cristalina 2 que tiene una pureza de aproximadamente un 90% producida utilizando el proceso sintético ilustrado en las Figuras 5A-5B.
- La Figura 14 es una gráfica que representa la seguridad una Forma cristalina 2 que tiene una pureza de aproximadamente un 95% producida utilizando el proceso sintético ilustrado en las Figuras 5A-5B.
- 10 La Figura 15 es una gráfica que representa la actividad antitumoral del Compuesto 1 con diferentes intervalos de tamaño de partícula.
- La Figura 16 es una gráfica que representa los datos PK *in vivo* del Compuesto 1 con diferentes intervalos de tamaño de partícula.
- 15 La Figura 17 es una gráfica que representa la correlación entre la disolución y el tamaño de partícula del Compuesto 1.
- La Figura 18 es una ilustración que representa las diferencias entre las terapias contra el cáncer convencionales y las específicas para células madre cancerosas.
- 20 La Figura 19 es una ilustración que representa una remisión completa de una lesión metastásica de cáncer de colon en el riñón.
- 25 La Figura 20 es una gráfica que ilustra la farmacocinética de una dosificación BID en pacientes, donde los pacientes recibieron dosis de 500 mg dos veces al día (dosis diaria total de 1000 mg).
- La Figura 21 es una gráfica que ilustra la farmacocinética de una dosificación de una vez al día en pacientes, donde los pacientes recibieron dosis de 20 mg una vez al día.
- 30 La Figura 22 es una gráfica que ilustra la comparación de la supervivencia sin progresión de pacientes con cáncer colorrectal tratados con el Compuesto 1. La supervivencia sin progresión (SSP) de los pacientes evaluables con cáncer colorrectal tratados con el Compuesto 1 se comparó con los datos históricos de la SSP para los mejores cuidados paliativos en pacientes con cáncer colorrectal.
- 35 La Figura 23 es una gráfica que ilustra la comparación de la supervivencia sin progresión (SSP) frente a la exposición farmacocinética. La SSP de los pacientes evaluables que recibieron el Compuesto 1 se comparó con la exposición al Compuesto 1 por encima o por debajo de 1,6 UM durante al menos 4 horas.
- 40 La Figura 24 es una gráfica que ilustra el patrón PK deseable para mejorar la seguridad y la eficacia.
- La Figura 25 es una fotografía que ilustra que los pacientes que consiguieron prolongar la enfermedad estable (> 16 semanas) durante el tratamiento con BBI608 tenían niveles elevados de p-STAT3 en sus tejidos tumorales antes del tratamiento.
- 45 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**
- A continuación, se analizan las realizaciones de la invención detalladamente. Al describir las realizaciones, se emplea una terminología específica en aras de la claridad. Sin embargo, no se pretende que la invención se limite a la terminología específica seleccionada este modo. Un experto en la técnica relevante reconocerá que se pueden emplear otros componentes equivalentes y que se pueden desarrollar otros métodos.
- 50 En este texto, una «fracción sustancial» de un conjunto de partículas puede ser al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 60 % o al menos aproximadamente un 50 % del número total de partículas en el conjunto.
- 55 La actividad contra las células madre cancerosas de una composición se puede determinar *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, la actividad antitumoral de una composición se puede determinar *in vitro* administrando el compuesto y midiendo la autorrenovación y supervivencia de las células madre cancerosas. Por ejemplo, la actividad antitumoral de un compuesto se puede evaluar *in vitro* comparando el comportamiento de las células tumorales a las que se les ha administrado el compuesto con el comportamiento de las células tumorales a las que no se les ha administrado el compuesto (un control). Por ejemplo, la actividad antitumoral de una composición se puede determinar *in vivo* midiendo, en un animal al que se le ha administrado el compuesto, el cambio en el volumen de un tumor, aplicando un modelo metastásico y/o aplicando un modelo ortotópico. Por ejemplo, la actividad antitumoral de un compuesto se

puede evaluar *in vivo* comparando un animal al que se le ha administrado el compuesto con un animal al que no se le ha administrado el compuesto (un control).

5 La tolerabilidad de una composición se puede determinar *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, la tolerabilidad de una composición se puede determinar *in vitro* administrando el compuesto y midiendo la tasa de división de las células normales, midiendo la absorción de nutrientes de las células normales, midiendo indicadores de la tasa metabólica de las células normales distintos de la absorción de nutrientes, midiendo el crecimiento de las células normales y/o midiendo otro indicador de la vitalidad de las células normales. Por ejemplo, la tolerabilidad de un compuesto se puede evaluar *in vitro* comparando el comportamiento de células normales a las que se le ha administrado el compuesto con el comportamiento de células normales a las que no se les ha administrado el compuesto (un control). Por ejemplo, la tolerabilidad de una composición se puede determinar *in vivo* midiendo, en un animal al que se le ha administrado el compuesto, el peso corporal o la ingesta de alimentos o haciendo observaciones clínicas, tales como la retención o pérdida de cabello, la actividad y/o la capacidad de respuesta a los estímulos. Por ejemplo, la tolerabilidad de un compuesto se puede evaluar *in vivo* comparando un animal al que se le ha administrado el compuesto con un animal al que no se le ha administrado el compuesto (un control).

10 20 25 A un compuesto, producto y/o composición farmacéutica se le puede asignar una clasificación de eficacia y/o una clasificación de toxicidad. Por ejemplo, la clasificación de eficacia puede ser proporcional a la actividad antitumoral o puede ser una función que aumenta de forma monótona con respecto a la actividad antitumoral. Por ejemplo, la clasificación de toxicidad puede ser inversamente proporcional a la tolerabilidad o puede ser una función que disminuye de forma monótona con respecto a la tolerabilidad. Se ha descrito un compuesto de naftofurano que carece de actividad antitumoral *in vivo*. Véase M.M. Rao y D.G.I. Kingston, *J. Natural Products*, 45(5) (1982) 600-604. Además, se ha descrito que el compuesto es igualmente tóxico para las células cancerosas y las células normales. Es decir, se ha descrito que el compuesto destruye tanto las células cancerosas como las células normales por igual, con lo que se concluye que el compuesto no tiene potencial para el tratamiento del cáncer. Véase K. Hirai K. *et al.*, *Cancer Detection and Prevention*, 23(6) (1999) 539-550; Takano A. *et al.*, *Anticancer Research* 29:455-464, 2009.

30 Sin embargo, los estudios experimentales que se describen en el presente documento indican que, cuando el compuesto se administra en forma de partículas que tienen una distribución adecuada de tamaño de partícula para conseguir una cierta exposición farmacocinética tal como se describe en esta publicación, el compuesto tiene una actividad antitumoral selectiva.

35 A los efectos de la presente invención, la «biodisponibilidad» de un fármaco se define como la cantidad relativa de fármaco de una forma farmacéutica administrada que entra en la circulación sistémica y la velocidad a la que el fármaco aparece en el torrente sanguíneo. La biodisponibilidad se rige por al menos tres factores: i) la absorción que controla la biodisponibilidad, seguida de ii) su redistribución tisular y iii) su eliminación (degradación metabólica más mecanismos renales y de otro tipo).

40 45 La «biodisponibilidad absoluta» se estima tomando en consideración la redistribución tisular y la biotransformación (es decir, la eliminación) que se puede estimar a su vez a través de la administración intravenosa del fármaco. A menos que se indique lo contrario, «HPLC» se refiere a cromatografía líquida de alta resolución; «farmacéuticamente aceptable» se refiere a materiales fisiológicamente tolerables, que normalmente no producen una reacción alérgica u otra reacción adversa, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administra a un mamífero; «mamífero» se refiere a una clase de vertebrados superiores, que incluyen el ser humano y todos los demás animales que alimentan a sus crías con leche secretada por las glándulas mamarias y tienen la piel generalmente más o menos cubierta de pelo; y se pretende que «tratamiento» englobe reducir, aliviar o eliminar al menos un síntoma de una enfermedad o enfermedades en un mamífero.

50 55 60 Se pretende que el término «tratamiento», tal como se utiliza en el presente documento, englobe la administración de compuestos de acuerdo con la invención profilácticamente para prevenir o suprimir una afección no deseada, y terapéuticamente para eliminar o reducir la extensión o los síntomas de la afección. El tratamiento también incluye prevenir la recaída de una afección no deseada, retrasar la progresión de una afección no deseada y prevenir o retrasar el inicio de una afección no deseada. El tratamiento de acuerdo con la invención se suministra a un ser humano u otro mamífero que tiene una enfermedad o afección que crea una necesidad de tal tratamiento. El tratamiento también incluye la aplicación del compuesto a células u órganos *in vitro*. El tratamiento puede ser por administración sistémica o local.

65 Una cantidad eficaz es la cantidad de principio activo que se administra en una dosis única o múltiples dosis necesarias para conseguir el efecto farmacológico deseado. Un profesional experto puede determinar y optimizar una dosis eficaz para un paciente individual o para tratar una afección individual mediante experimentación y titulación rutinarias, que son muy conocidas por el médico experto. La dosis real y el programa pueden variar dependiendo de si las composiciones se administran en combinación con otros fármacos, o dependiendo de las diferencias entre individuos en la farmacocinética, la disposición de los fármacos y el metabolismo. Del mismo modo, las cantidades pueden variar para las aplicaciones *in vitro*. Está dentro de las competencias de la técnica ajustar la dosis de acuerdo con las necesidades de una situación particular sin demasiada experimentación. Cuando se divultan en el presente

documento, los intervalos de dosis no excluyen el uso de una dosis más alta o más baja de un componente, como podría justificarse en una aplicación particular.

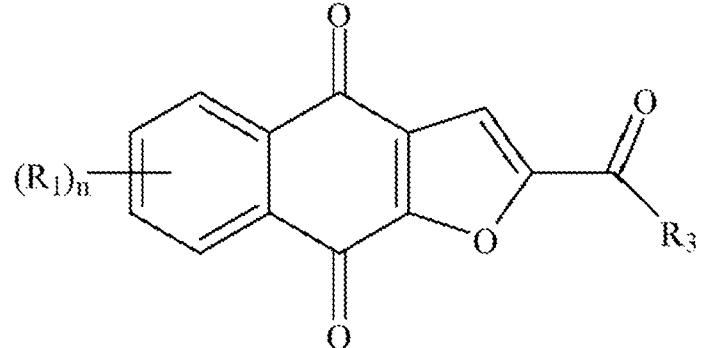
Las descripciones de las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en el presente documento incluyen 5 composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración a seres humanos. El experto entenderá, basándose en esta divulgación, que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a cualquier mamífero u otro animal. La preparación de composiciones adecuadas para la administración a varios animales está bien documentada, y el veterinario farmacólogo con experiencia ordinaria puede diseñar y realizar tales 10 modificaciones con experimentación rutinaria basándose en composiciones farmacéuticas para la administración a seres humanos.

Estructura y propiedades de los compuestos

15 Un compuesto de naftofurano de Fórmula I, tal como 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-20 etilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, fue prácticamente insoluble en agua y un amplio panel de disolventes evaluados, que incluyeron DMSO (sulfóxido de dimetilo), N-metilpirrolidina, DMA (dimetilacetamida), etanol, PEG400 (polietilenglicol 400), propilenglicol, Cremophor EL (aceite de ricino polietoxilado), Labrasol (macroglicéridos caprilocaproílicos (polioxiglicéridos)), Labrafil M (éster PEG-6 (polietilenglicólico) de aceite vegetal) y Capryol (caprilato de propilenglicol). El compuesto de naftofurano puede ser soluble en una gama de disolventes orgánicos polares, tales como ciertos hidrocarburos halogenados, p. ej., hidrocarburos clorados, como cloruro de metileno, ésteres, acetato de etilo, ácidos carboxílicos, como ácido acético, cetonas, como acetona, y alcoholes, como metanol. Se observó que el compuesto de naftofurano era soluble en cloruro de metileno y acetato de etilo.

25 Los estudios experimentales descritos en el presente documento, que determinaron que se conseguía actividad antitumoral selectiva mediante la administración del compuesto activo de una composición farmacéutica en forma de partículas pequeñas para conseguir una cierta exposición farmacocinética para la actividad anticancerosa selectiva, se centraron en un compuesto de naftofurano. Teniendo en cuenta las observaciones que se acaban de discutir 30 realizadas con el compuesto, otros naftofuranos, por ejemplo, los naftofuranos, pueden exhibir de manera similar una modificación ventajosa de sus perfiles farmacocinéticos para conseguir una cierta exposición farmacocinética para conseguir una actividad anticancerosa selectiva cuando se administran en forma de partículas de diámetro pequeño. El perfil farmacocinético de otros naftofuranos administrados como una o más distribuciones diferentes de tamaño de partícula se puede determinar experimentalmente.

35 Algunos otros compuestos que pueden exhibir una mejora en su perfil farmacocinético y eficacia con una disminución en el tamaño de partícula de la forma en que se administran a un animal, un mamífero o un ser humano, como se observa para el compuesto evaluado en los ejemplos, incluyen los que se presentan como Fórmula I, y sales y solvatos de estos.



40 Fórmula I

En la Fórmula I, la notación $(R_1)_n$ indica que un sustituyente (R_1) se encuentra como sustituyente independientemente 45 en cada posición disponible a lo largo del anillo de benceno. Por ejemplo, con n igual a 4, los cuatro sustituyentes R_1 pueden ser todos iguales o pueden ser cada uno diferente de los demás. Por ejemplo, cada (R_1) se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, flúor, ciano, nitró, CF_3 , OCF_3 , alquilo, metilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, OR_a , SR_a y NH_2 . El alquilo puede incluir restos que tienen, por ejemplo, de 1 a 8 átomos de carbono conectados mediante enlaces sencillos, el alquenilo puede incluir restos que tienen, por ejemplo, de 2 a 8 átomos de carbono conectados mediante uno o más dobles enlaces, y el alquinilo puede incluir restos que tienen, por ejemplo, de 2 a 8 átomos de carbono conectados mediante uno o más triples enlaces. Los sustituyentes pueden incluir restos tales como hidrógeno, 50

halógeno, ciano, nitro, arilo, OR_a , SR_a y NH_2 . Por ejemplo, cada (R_1) se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, F (flúor), Cl (cloro), Br (bromo), I (yodo), OH (hidroxilo) y NH_2 (amino). Por ejemplo, R_3 se puede seleccionar del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, flúor, ciano, CF_3 , OCF_3 , alquilo, metilo, alquilo sustituido, alquilo sustituido con halógeno, alquilo sustituido con hidroxilo, alquilo sustituido con amino, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, OR_a , SR_a y NR_bR_c . Por ejemplo, R_3 se puede seleccionar del grupo que consiste en metilo y $C(R_8)_3$. Cada (R_8) se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo, F (flúor), Cl, Br, I, OH y NH_2 . Por ejemplo, como máximo dos de los sustituyentes (R_1) seleccionados independientemente y los sustituyentes (R_8) se pueden seleccionar para que sean F (flúor), seleccionándose el resto para que sean hidrógeno.

En algunos ejemplos o ejemplos de referencia que se describen en el presente documento, el compuesto de Fórmula I se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, cada (R_1) se puede seleccionar para que sea hidrógeno y R_3 se puede seleccionar para que sea metilo, de manera que el compuesto de Fórmula I es 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona. Por ejemplo, cada R_a se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo y arilo sustituido. Por ejemplo, cada R_b y R_c se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo y alilo sustituido. Como alternativa, un R_b y R_c junto con el átomo de N al que están unidos pueden formar un heterociclo o heterociclo sustituido.

25 Polimorfos

La divulgación también describe, únicamente como referencia, polimorfos de los compuestos de naftofurano. En algunos ejemplos de referencia descritos en el presente documento, el polimorfo es un polimorfo de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo del Compuesto 1. Por ejemplo, en algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar al que se expone en la Figura 1. En el presente documento se hace referencia a este polimorfo como «Forma cristalina 1», «Forma 1» o «DRXP1» y estos términos se utilizan indistintamente. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar al que se expone en la Figura 2. En el presente documento se hace referencia a este polimorfo como «Forma cristalina 2», «Forma 2» o «DRXP2» y estos términos se utilizan indistintamente. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar al que se expone en la Figura 3. En el presente documento se hace referencia a este polimorfo como «Forma cristalina 3», «Forma 3» o «DRXP3» y estos términos se utilizan indistintamente.

40 Por ejemplo, en algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a aproximadamente 10,2, 11,4, 11,9, 14,1, 14,5, 17,3, 21,0, 22,2, 24,0, 26,0 y 28,1 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a aproximadamente 10,2, 11,9, 14,1, 14,5, 17,3, 22,2 y/o 28,1 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 10,2 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 11,9 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 14,1 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 14,5 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 17,3 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 22,2 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 28,1 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye dos o más picos de entre un pico al menos a aproximadamente 10,2 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 11,9 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 14,1 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 14,5 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 17,3 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 22,2 grados 2θ y un pico al menos a aproximadamente 28,1 grados 2θ y cualesquiera combinaciones de estos.

Por ejemplo, en algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a aproximadamente 7,5, 9,9, 11,4, 12,3, 15,0, 23,0, 23,3, 24,1, 24,6, 25,0, 26,1, 27,0 y 28,4 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye uno o más picos al menos a aproximadamente 7,5, 9,9, 12,3, 15, 23,0, 23,3, 24,6 y/o 28,4 grados 2θ.

5 En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 7,5 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 9,9 grados 2θ.

10 En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 12,3 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 15 grados 2θ.

15 En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 23 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 23,3 grados 2θ.

20 En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye un pico al menos a aproximadamente 24,6 grados 2θ. En algunos ejemplos de referencia, el polimorfo es un polimorfo de 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona caracterizado por un patrón de difracción de rayos X que incluye dos o más picos de entre un pico al menos a

25 aproximadamente 7,5 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 9,9 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 15 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 12,3 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 23,0 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 23,3 grados 2θ, un pico al menos a aproximadamente 24,6 grados 2θ y un pico al menos a aproximadamente 28,4 grados 2θ y cualesquier combinaciones de estos.

30 La Forma cristalina 1 se ha detectado en varios disolventes y condiciones, pero se ha demostrado que tiene una actividad antitumoral baja (Figura 8). En los estudios que se muestran en la Figura 8, ratones inmunodeprimidos con cáncer de cabeza y cuello humano FaDu subcutáneo establecido recibieron la cantidad indicada de Compuesto 1 triturado a mano con Forma cristalina 1, o control de vehículo por vía oral (po). El Compuesto 1 se formuló en GELUCIRE™. Todos los regímenes se administraron a diario (qd). Los tamaños tumorales se evaluaron periódicamente durante el tratamiento.

35 La Forma cristalina 2 se obtuvo sorprendentemente en presencia de una impureza, y se ha demostrado que este polimorfo exhibe una actividad antitumoral potente (Figura 9). En el estudio que se muestra en la Figura 9, ratones inmunodeprimidos con cáncer de cabeza y cuello humano FaDu subcutáneo establecido recibieron 100 mg/kg de 40 Compuesto 1 micronizado producido con el proceso sintético descrito en las Figuras 5A y 5B (primer lote), o control de vehículo por vía oral (po). El Compuesto 1 se formuló en GELUCIRE™. Todos los regímenes se administraron a diario (qd). Los tamaños tumorales se evaluaron periódicamente durante el tratamiento. La Forma 2 se fabricó con éxito mediante un proceso actual de Buenas Prácticas de Fabricación (cGMP, por sus siglas en inglés) y ha recibido la aprobación de la FDA y Health Canada para ser utilizado en ensayos clínicos. La Forma 2 ha mostrado una farmacocinética deseable (Figura 11), seguridad y potentes signos de actividad antitumoral en pacientes con cáncer.

45 Se ha demostrado que la Forma cristalina 3 comparte un patrón de difracción de rayos X en polvo (DRXP) similar, pero diferente, al de la Forma 1, y muestra un comportamiento cristalino muy diferente al de la Forma 1 (Fig. 7A y B). La Forma 3 solo se puede generar a partir de la Forma 1 utilizando un proceso de suspensión especialmente diseñado que se describe en el presente documento. Se ha demostrado que la Forma 3 exhibe actividades antitumorales potentes (Figura 10). En el estudio que se muestra en la Figura 10, ratones inmunodeprimidos con cáncer de cabeza y cuello humano FaDu subcutáneo establecido recibieron 200 mg/kg de Compuesto 1 con Forma cristalina 1 o Forma 50 3 triturada a mano, o control de vehículo por vía oral (po). El Compuesto 1 se formuló en Gelucire. Todos los regímenes se administraron a diario (qd). Los tamaños tumorales se evaluaron periódicamente durante el tratamiento. Este polimorfo se fabricó con éxito mediante un proceso de cGMP y ha recibido la aprobación de la FDA y Health Canada para ser utilizado en ensayos clínicos. La Forma 3 también ha mostrado una farmacocinética deseable (Figura 12), seguridad y potentes signos de actividad antitumoral en pacientes con cáncer.

55 El proceso sintético para preparar la Forma cristalina 2 se muestra en las Figuras 5A-5B. En resumen, se añade 3-buten-2-ona (451,2 gramos) a un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 litros dotado de un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición. Se añade bromo (936,0 gramos) al embudo de adición. Despues de que el contenido del matraz se haya enfriado hasta -5 °C, se adiciona el bromo al matraz con agitación energética y manteniendo la temperatura a -5 °C durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 15 minutos adicionales a -5 °C y a continuación se divide en 4 porciones iguales. Cada porción de la mezcla junto con tetrahidrofuran (2133,6 gramos) se introduce en un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 22 litros dotado de un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición. Se añade DBU (1,3-diazabiciclo[5,4,0]undec-7-eno, 222,9 gramos) al embudo de adición. Se adiciona el DBU

al matraz con agitación enérgica y manteniendo la temperatura a 0 °C-5 °C durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 15 minutos adicionales a 0 °C-5 °C. A continuación, se añade 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (231 gramos) al matraz. Se introduce DBU adicional (246,0 gramos) en el embudo de adición y a continuación se adiciona a la mezcla en el matraz a una velocidad tal que la temperatura de la mezcla de reacción no exceda 40 °C. Después de completar la adición de DBU, la mezcla resultante se agita durante la noche a temperatura ambiente, y se toma una muestra de la mezcla de reacción para el análisis de HPLC. Se añade agua (10,8 litros) a la mezcla de reacción y la mezcla resultante se enfriá hasta 0 °C-3 °C durante al menos 30 minutos, y a continuación se filtra a través de un filtro de vacío. El sólido filtrado se lava sucesivamente con bicarbonato de sodio acuoso al 5 % (3 litros), agua (3 litros), ácido acético acuoso al 1 % (3 litros) y etanol dos veces (2 X 1 litro). El sólido lavado se almacena y se agrupa con los otros lotes. El producto crudo combinado (28,73 kg) se introduce junto con acetato de etilo (811,7 kg) en un recipiente de 500 galones dotado de un agitador mecánico, termómetro y un condensador. En atmósfera de nitrógeno, la mezcla se calienta a refluo (72 °C) durante 2 horas y a continuación se filtra con un filtro de cartucho de 10 micras que contiene una capa de carbón activo para eliminar los componentes insolubles. Se utiliza acetato de etilo caliente recién preparado (10 kg) para lavar el recipiente, la línea de transferencia y el filtro. El filtrado combinado se enfriá hasta 0-5 °C y se mantiene a esta temperatura durante 2 horas, y a continuación se filtra con un filtro Buchner de 20 pulgadas. El producto sólido filtrado se lava con acetato de etilo a 0-5 °C (5,7 kg) y se seca al vacío a 40 °C hasta obtener un peso constante. El filtrado restante se reduce en volumen en un 63 % por evaporación, y el proceso de cristalización se repite de nuevo para generar un segundo lote de producto que también se secó en las mismas condiciones que el primer lote de producto. Ambos lotes obtenidos son la Forma cristalina 2. El primer lote producido (0,5 kg) tuvo una pureza de un 99,5 % según HPLC (~95 % según RMN). El segundo lote producido (1,09 kg) tuvo una pureza de un 98,9 % según HPLC (~90 % según RMN).

El proceso sintético para preparar la Forma cristalina 3 se muestra en las Figuras 6A-6D. Los pasos se exponen brevemente en el presente documento. Paso 1: Se somete 3-buten-2-ona (cetona metil vinílica, MVK) a bromación utilizando bromo. No se utiliza disolvente adicional. El intermedio 3,4-dibromobutan-2-ona se disuelve en tetrahidrofuran (THF) y se hace reaccionar con 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) para formar un segundo intermedio, 3-bromo-3-buten-2-ona. Una vez completada esta reacción, se añade 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (HNQ). Se añade una segunda porción de DBU y la mezcla se expone al aire. La reacción se desactiva con agua y los sólidos se recogen mediante filtración. Estos sólidos se lavan con bicarbonato de sodio acuoso, ácido acético acuoso, agua y etanol. El producto se aísla suspendiéndolo en etanol y recolectando los sólidos. Paso 2: Las cantidades residuales de 2-acetil-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona que acompañan a la 2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona deseada (Compuesto 1) se oxidan para obtener el Compuesto 1 con dióxido de manganeso activado en tolueno. La mezcla se filtra a través de un lecho de carbón y Celite. El filtrado se concentra para que precipite el producto, el cual se filtra y se seca. Paso 3: Los sólidos se suspenden en acetato de etilo (25 ml/g de Compuesto 1 purificado) a 75 °C-80 °C durante aproximadamente 5 h, se recolectan mediante filtración y se secan. El Compuesto 1 producido con este método es la Forma cristalina 3. El Compuesto 1 producido con este método sin el proceso de suspensión proporcionó la Forma cristalina 1.

Efecto de la distribución de tamaño de partícula del compuesto sobre la concentración del fármaco en plasma sanguíneo y la actividad antitumoral selectiva

Antes de la presente invención, no se habían creado ni evaluado micropartículas del Compuesto 1. Estudios previos habían demostrado que el Compuesto 1 era igualmente tóxico para las células normales y cancerosas, y no se había observado actividad antitumoral en un modelo con animales. Los estudios que se exponen en el presente documento demuestran que la reducción del tamaño de partícula del Compuesto 1 no solo mejoró la biodisponibilidad, sino que también llevó a una mayor actividad antitumoral selectiva sin signos de toxicidad. Esto es inesperado ya que la mejora de la biodisponibilidad aumentaría la exposición al Compuesto 1 por igual para las células cancerosas y las células normales. El mecanismo para la mejora selectiva de la actividad anticancerosa sin aumento de la toxicidad para las células normales no se conocía. En estos estudios, al parecer la mejora en la biodisponibilidad del Compuesto 1 se maximizó cuando el valor de D_{50} (es decir, el punto de la mediana de la distribución del tamaño de partícula que divide la distribución en dos partes iguales) fue de aproximadamente 20 μm . Sin embargo, se llevaron a cabo estudios adicionales donde el valor de D_{50} fue de aproximadamente 2 μm . Las micropartículas del Compuesto 1 con un valor de D_{50} de 2 micras presentaron una actividad antitumoral sorprendentemente mejorada, a pesar de que no hubiera ninguna mejora en la exposición farmacocinética en comparación con las partículas con un valor de D_{50} de 20 micras. En estudios adicionales, se crearon nanopartículas del Compuesto 1 con un valor de D_{50} de aproximadamente 100 nanómetros ($D_{50} = 110,4$ nanómetros), pero sorprendentemente se observó una reducción de la actividad antitumoral con este tamaño de partícula del Compuesto 1. En consecuencia, las composiciones que contienen partículas del Compuesto 1, p. ej., micropartículas, tienen un valor de D_{50} igual o inferior a 20 micras e igual o superior a 0,2 micras y poseen una actividad antitumoral sorprendentemente potente sin aumento de la citotoxicidad para las células normales.

La actividad antitumoral de las partículas del Compuesto 1 con diferentes intervalos de tamaño de partícula se ilustra en la Figura 15, y los datos farmacocinéticos de las partículas del Compuesto 1 con diferentes intervalos de tamaño de partícula se ilustran en las Figuras 16-18. En el estudio que se muestra en la Figura 15, ratones inmunodeprimidos con cáncer de cabeza y cuello humano FaDu subcutáneo establecido recibieron la cantidad indicada de Compuesto 1

con el tamaño de partícula indicado, o control de vehículo por vía oral (po). Todos los regímenes se administraron a diario (qd). El tamaño del tumor se evaluó periódicamente.

- 5 Se observó que la administración del compuesto de naftofurano en forma de partículas que tienen un tamaño de partícula definido, p. ej., un tamaño de partícula reducido, aumentó la concentración del fármaco en plasma *in vivo*. En el presente documento, a menos que se indique lo contrario, los términos «tamaño» y «diámetro» se utilizarán indistintamente para describir las partículas. Se debe entender que el uso del término «diámetro» no implica necesariamente que una partícula tenga una forma perfecta o aproximadamente esférica. Por ejemplo, «diámetro» se puede utilizar como una aproximación del tamaño de una partícula, por ejemplo, el diámetro de una esfera de volumen equivalente a una partícula no esférica.
- 10 En un resultado sorprendente, se observó que la administración de partículas de compuesto de naftofurano de una distribución definida de tamaño de partícula, p. ej., como partículas pequeñas, en una composición farmacéutica dio como resultado una actividad antitumoral selectiva. Por ejemplo, el compuesto administrado como partículas que tienen una mediana de tamaño de partícula de 20 µm (es decir, micras, estos términos se utilizan indistintamente en el presente documento) mostró eficacia (actividad antitumoral selectiva), aunque relativamente débil, en modelos de xenoinjerto de ratón. En comparación, las partículas de 150 µm (micras) no mostraron eficacia. El descubrimiento de que la administración del compuesto de naftofurano en forma de partículas más pequeñas puede dar como resultado una actividad antitumoral selectiva es sorprendente, y no se puede explicar basándose en una mejora de la solubilidad o biodisponibilidad por sí sola. Es decir, en general, una solubilidad mejorada se asocia con un aumento de la biodisponibilidad oral del fármaco, que puede aumentar la toxicidad para las células normales, así como la actividad antitumoral. Tal como se ha mencionado anteriormente, el compuesto de naftofurano puede ser igualmente tóxico para las células tumorales y las células normales si la exposición no se lleva a cabo en condiciones definidas tal como se describe en los documentos WO 2009/036099 y WO 2009/036101.
- 15 25 En otro resultado sorprendente, se observó que la administración de las partículas del compuesto de naftofurano de un tamaño más reducido, en una composición farmacéutica, dio como resultado una actividad antitumoral significativamente mejorada, pero casi un perfil farmacocinético inalterado, es decir, una biodisponibilidad inalterada. Por ejemplo, el compuesto administrado como partículas con una mediana de tamaño de partícula de 2 µm (micras) mostró una eficacia dramáticamente mejorada en modelos de xenoinjerto de ratón. En comparación con las partículas de 20 µm, las partículas de 2 µm mostraron una eficacia significativamente mejorada pero un perfil farmacocinético muy similar. Dicho de otro modo, tal eficacia mejorada es independiente del perfil farmacocinético, es decir, la biodisponibilidad. El resultado es muy sorprendente, ya que para un compuesto de este tipo con mala solubilidad, la eficacia mejorada se asocia generalmente con una mayor biodisponibilidad oral del fármaco.
- 30 35 40 La mejoría observada en la actividad antitumoral selectiva es, por lo tanto, sorprendente e inesperada. En el presente documento se describe una partícula o partículas de un compuesto de naftofurano, por ejemplo, un compuesto de Fórmula I, que son activas, es decir, tienen eficacia o actividad antitumoral selectiva. La partícula o las partículas activas tienen un tamaño de partícula definido, por ejemplo, tienen un diámetro inferior o igual a aproximadamente 20 µm, aproximadamente 10 µm, aproximadamente 5 µm, aproximadamente 4 µm, aproximadamente 3 µm, aproximadamente 2 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 0,5 µm, aproximadamente 0,2 µm o aproximadamente 0,1 µm. La partícula o las partículas que son más grandes que el tamaño de partícula definido son inactivas o menos activas que las partículas descritas en el presente documento.
- 45 50 55 60 65 Por lo tanto, la administración del compuesto de naftofurano u otro compuesto de acuerdo con la Fórmula I en forma de partículas más pequeñas puede dar como resultado una mejora en su actividad antitumoral selectiva. El uso de partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I que tienen una distribución definida de tamaño de partícula en la dosificación puede permitir el establecimiento de la actividad antitumoral selectiva deseada. Por ejemplo, el uso de partículas de compuesto de naftofurano que tienen una distribución definida de tamaño de partícula, por ejemplo, que son partículas más pequeñas, puede dar como resultado una mayor concentración en sangre durante un período de tiempo más corto, y una actividad antitumoral selectiva, aunque relativamente débil. La reducción adicional del tamaño de partícula del compuesto puede conducir a una eficacia significativamente mejorada con una concentración en plasma inalterada del compuesto.
- En el presente documento, a menos que se indique lo contrario, las expresiones «concentración plasmática en sangre», «concentración molar en sangre» y «concentración en sangre» se utilizan indistintamente. El término «neoplasia» se puede utilizar para describir células que exhiben un patrón anómalo de crecimiento. Tal neoplasia puede incluir tumores, tanto benignos como malignos, p. ej., tumores sólidos, así como otros trastornos del crecimiento celular, tales como leucemia, que no tienen una forma definida y no se limitan a una región específica del cuerpo humano o animal. Por lo tanto, «neoplasia» incluye células y tejidos neoplásicos tanto cancerosos como no cancerosos. En el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se deje claro o se refiera a un estudio o experimento específico, se debe entender que los términos «tumor» y «cáncer» se refieren a la clase más amplia de todas las neoplasias, incluidas las que no se limitan a una región específica del cuerpo humano o animal. Sin embargo, se debe entender que la expresión más limitada «tumor sólido» no incluye los trastornos del crecimiento celular, tales como leucemia, que no tienen una forma definida y no se limitan a una región específica del cuerpo humano o animal.

Una neoplasia puede exhibir ninguna, una o más de las siguientes características: forma sólida (un tumor sólido), malignidad, metástasis o actividad de la vía de STAT 3. Una neoplasia puede, por ejemplo, incluir una célula madre cancerosa. Una neoplasia puede ser, por ejemplo, un carcinoma, sarcoma, adenocarcinoma, linfoma o neoplasia hematológica maligna.

5 La absorción se ha definido como el proceso mediante el cual se toma un fármaco desde el sitio de administración hasta el sitio de medición dentro del cuerpo. Véase M. Rowland, T.N. Tozer (1995) *Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications*. Lippincott Williams & Wilkins. A menudo se hace referencia a la absorción oral del fármaco como transferencia del fármaco a través de la membrana apical del enterocito, porque se considera que la membrana apical 10 es el paso limitante de la velocidad para la permeación de la membrana. Véase U. Fagerholm y H. Lennernäs (1995) «Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption», *Eur J Pharm Sci* 3: 247-253; M.B. Lande, J.M. Donovan y M.L. Zeidel (1995) «The relationship 15 between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons», *J Gen Physiol* 106: 67-84. La permeabilidad es un término general que describe la facilidad con la que el fármaco se transfiere a través de una membrana. Las características específicas de permeabilidad de un fármaco dependen de sus propiedades fisicoquímicas, que incluyen lipofilia, carga, tamaño y área de superficie polar. Véase Rowland y Tozer 1995; C.A. 20 Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy y P.J. Feeney (2001) «Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings», *Adv Drug Deliv Rev* 46: 3-26. La tasa de absorción depende de la permeabilidad del fármaco, el área superficial de la membrana y el gradiente de concentración 25 a lo largo de la membrana. El gradiente de concentración es la fuerza impulsora para la difusión pasiva, el mecanismo más común para el transporte del fármaco a través de la membrana. Para la administración oral, el fármaco se absorbe principalmente en el intestino. El intestino humano tiene aproximadamente 5-8 metros de longitud y tiene un área superficial total de casi 200 metros cuadrados, mientras que el intestino de un ratón tiene solo aproximadamente 10-20 cm de longitud. Por lo tanto, se puede predecir que un fármaco con un tamaño de partícula más grande puede tener una tasa de absorción superior o igual en seres humanos que un fármaco con un tamaño de partícula más pequeño en un ratón, a pesar de que la permeabilidad del fármaco con un tamaño de partícula más grande sea más baja que la del fármaco con un tamaño de partícula más pequeño.

30 Por ejemplo, se puede predecir que una distribución de tamaño de partícula de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, que tenga una mediana de diámetro inferior o igual a aproximadamente 20 µm, 10 µm, 5 µm, 4 µm, 3 µm, 2 µm, 1 µm, 0,5 µm o 0,2 µm dará como resultado una actividad antitumoral selectiva cuando se administre en una formulación farmacéutica, p. ej., para el tratamiento de un cáncer o tumor. Por ejemplo, la distribución de tamaño de partícula puede ser tal que las partículas tengan una mediana de diámetro de aproximadamente 0,02 µm a 35 aproximadamente 5 µm, o de aproximadamente 0,2 µm a aproximadamente 4 µm. Por ejemplo, la distribución de tamaño de partícula puede ser tal que las partículas tengan una mediana de diámetro inferior o igual a aproximadamente 5 µm, una relación del diámetro medio respecto a la mediana del diámetro de como máximo aproximadamente 2, y una relación del modo del diámetro respecto a la mediana del diámetro de como mínimo aproximadamente 0,25.

40 El término «partícula» se puede referir a un agregado de un compuesto de Fórmula I. El término «medio» se puede referir a la suma de los tamaños de todas las partículas dividida por el número total de partículas. El término «mediana» se puede referir, p. ej., a un diámetro del cual la mitad de las partículas tienen un diámetro mayor y la mitad de las partículas tienen un diámetro menor. El término «modo» puede indicar el valor de tamaño de partícula más frecuente. La expresión «total acumulado» se puede referir a todas las partículas.

45 La actividad antitumoral selectiva conseguida mediante la administración de las partículas del compuesto de naftofurano puede depender no solo de la distribución del tamaño de partícula, p. ej., los volúmenes de las partículas o los diámetros representativos de esos volúmenes, sino también de la forma y la distribución de las formas de las partículas. Por ejemplo, un conjunto de partículas con forma de aguja puede dar como resultado un perfil farmacocinético diferente que un conjunto de partículas con forma esférica. Por lo tanto, puede resultar deseable medir 50 la forma y la distribución de la forma de las partículas que se han de administrar y/o utilizar un proceso que produzca partículas con una forma y una distribución de la forma predeterminadas, por ejemplo, una forma casi uniforme, p. ej., que las partículas sean aproximaciones de esferas. Por ejemplo, la esfericidad, Ψ , de una partícula se puede definir como

$$\Psi = \frac{\pi^{1/3} (6V_p)^{2/3}}{A_p},$$

55 donde V_p es el volumen de la partícula y A_p es el área superficial de la partícula. Una esfera tiene una esfericidad de $\Psi = 1$, y cuanto más cercana sea la esfericidad de una partícula a la unidad, más se aproximarán la forma de la partícula a una esfera. A modo de comparación, un tetraedro tiene una esfericidad de aproximadamente 0,671, un cubo tiene una esfericidad de aproximadamente 0,806, un octaedro tiene una esfericidad de aproximadamente 0,846, un dodecaedro tiene una esfericidad de aproximadamente 0,910, y un icosaedro tiene una esfericidad de aproximadamente 0,939. Debido a que la forma de una esfera minimiza el área superficial para un volumen dado,

cabe esperar que una partícula que sea casi esférica se disuelva más lentamente que una partícula del mismo volumen que sea menos casi esférica. La esfericidad media de un conjunto de esferas se puede definir como

$$\Psi_m = \frac{\pi^{1/3} (6 \sum V_p)^{2/3}}{\sum A_p},$$

5 donde ΣV_p es el volumen total de todas las partículas ΣA_p es el área superficial total de todas las partículas. Por ejemplo, las partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I administradas pueden tener una esfericidad media de al menos aproximadamente 0.8, o una esfericidad media de al menos aproximadamente 0.9.

- 10 El tamaño, la distribución del tamaño, la forma, la distribución de la forma y factores tales como la rugosidad o la irregularidad de la superficie de las partículas pueden afectar al área superficial específica media del conjunto de partículas del Compuesto 1 que se administran en una formulación farmacéutica. El área superficial específica media se puede definir como $\Sigma A_p / \Sigma m_p$, donde ΣA_p es el área superficial total de las partículas y Σm_p es la masa total de las partículas. Cabe esperar que cuanto mayor sea el área superficial específica media de las partículas, más rápida será la disolución de las partículas.

Las partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I en una formulación farmacéutica pueden incluir el compuesto de naftofurano en un estado cristalino a través de diferentes partículas o dentro de la misma partícula. El estado cristalino puede incluir uno o más polimorfos, a través de diferentes partículas o dentro de la misma partícula.

- 20 Estado cristalino puede incluir uno o más polimorfos, a través de diferentes partículas o dentro de la misma partícula. Como apreciará un experto en la técnica, cabe esperar que la tasa de disolución de las partículas pueda verse afectada por el estado de la materia en las partículas del compuesto, por ejemplo, si es cristalino, de un primer polimorfo o un segundo polimorfo.

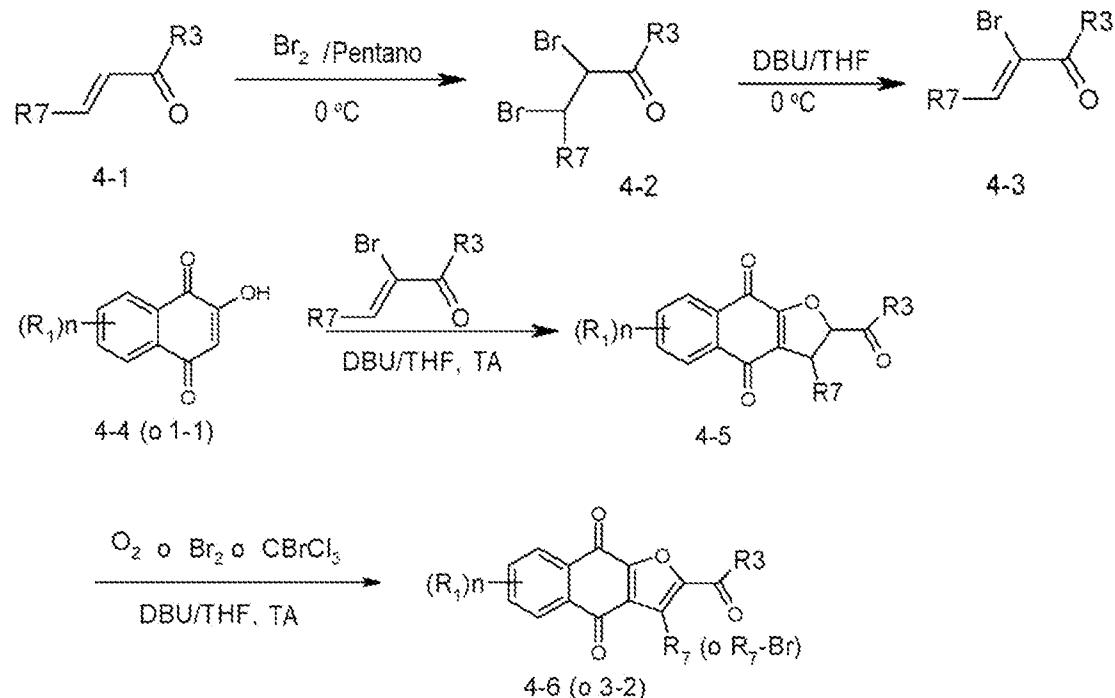
Se puede aplicar una o más de entre una gama de técnicas para determinar el tamaño y/o la distribución del tamaño de las partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I en una composición farmacéutica. Se puede aplicar,

- por ejemplo, análisis por tamizado, recuento microscópico óptico, recuento de micrografías electrónicas, recuento de la electrorresistencia, tiempo de sedimentación, difracción láser y/o espectroscopía acústica. Se pueden aplicar

el área específica de las partículas del compuesto de naftofurano en una formulación farmacéutica. Se puede aplicar una isoterma BET y/o una técnica de superficie específica de permeabilidad al aire para determinar el área específica de las partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I en una formulación farmacéutica.

Procesos para generar los compuestos de naftofurano

- 35 Los documentos WO 2009/036099 y WO 2009/036101 divulgan un proceso para la preparación de un compuesto de naftofurano de Fórmula II de la siguiente manera.



DBU: 1,8-Diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno;

THF: Tetrahidrofurano;

5 TA: Temperatura ambiente.

En este proceso, se hace reaccionar 3-bromo-3-buten-2-ona (4-3) con 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (4-4) en un recipiente abierto en contacto con el aire, lo que da como resultado 2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (4-5). La 2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (4-5) se oxida con el oxígeno del aire libre para convertirse en nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (4-6). De este modo, se produce nafto[2,3-b]furan-4,9-dione mediante este proceso. Sin embargo, durante el desarrollo posterior del compuesto, se determinó que este proceso siguió generando varias impurezas significativas que dificultan las aplicaciones clínicas potenciales de estos compuestos. En algunas realizaciones, una de las impurezas es 2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (4-5).

15 En el presente documento se describe un proceso mejorado para la preparación de naftofuran. El proceso mejorado minimiza las impurezas y por lo tanto produce naftofuran sustancialmente puro. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión «sustancialmente puro» se refiere a un preparado que incluye al menos aproximadamente un 80 % o más, medido como % de área por HPLC, del compuesto de la presente invención. El naftofuran puede ser nafto[2,3-b]furan-4,9-diona y sus compuestos relacionados (4-6).

20 El proceso puede incluir oxidar el producto crudo del acoplamiento de 3-bromo-3-buten-2-ona (4-3) y 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (4-4) con un agente oxidante en un primer disolvente. El agente oxidante puede ser dióxido de manganeso (MnO_2). El producto crudo se puede aislar antes de oxidarlo. El primer disolvente puede ser tolueno o cloroformo.

25 El proceso puede incluir tratar la mezcla de oxidación en reposo con carbón vegetal para deshacerse de ciertas impurezas. La mezcla de oxidación en reposo se puede filtrar con un lecho de carbón activado. La mezcla se puede filtrar a aproximadamente 100 °C.

30 El proceso puede incluir además cristalizar el producto a partir del filtrado. El producto se puede cristalizar concentrando el filtrado con evaporación y enfriándolo.

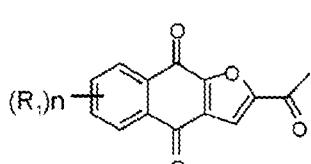
El proceso puede incluir además recristalizar el producto con un segundo disolvente. El segundo disolvente puede ser acetato de etilo.

35 Como alternativa, el proceso puede incluir además suspender en un segundo disolvente el producto cristalizado en el primer disolvente, calentar la suspensión y enfriar la suspensión. El segundo disolvente puede ser acetato de etilo. El producto se puede suspender y calentar solamente hasta obtener una disolución parcial. El volumen del segundo disolvente utilizado para suspender el producto puede ser de aproximadamente 1/10, 1/5, 1/4, 1/3, 1/2 o 2/3 del volumen para obtener la disolución completa del producto en las condiciones de calentamiento.

45 En el presente documento también se describe un compuesto de naftofuran preparado mediante el proceso descrito en el presente documento. El compuesto de naftofuran se puede seleccionar del grupo que consiste en 2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafato[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafato[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-etylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, éster mono[1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico] del ácido fosfórico, éster dimetílico y éster 1-(4,9-dioxo-3a,4,9,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico del ácido fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos. El compuesto de naftofuran se puede preparar mediante un proceso que incluye hacer reaccionar el producto crudo aislado del acoplamiento de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (4-4) y 3-bromo-3-buten-2-ona (4-3) con dióxido de manganeso en presencia de tolueno. El proceso puede incluir además filtrar la mezcla de reacción en reposo con un lecho de carbón activado.

50 En el presente documento se describe que la presente invención y/o divulgación proporciona compuestos de naftofuran sustancialmente puros.

55 En algunos ejemplos y ejemplos de referencia que se describen en el presente documento, se proporciona un compuesto sustancialmente puro de Fórmula II,



(II)

en donde cada R₁ es independientemente H, Cl o F; y n es 0, 1, 2, 3 o 4.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, «sustancialmente puro» se refiere a una pureza de al menos
aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, la pureza de un compuesto de la presente invención es una
pureza de al menos aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o
aproximadamente un 99 %. En una realización adicional, la pureza de un compuesto de la presente invención es una
pureza de al menos aproximadamente un 99,5 % o aproximadamente un 99,8 %. En una realización adicional más, la
pureza de un compuesto de la presente invención es una pureza de al menos aproximadamente un 99,85 %,
aproximadamente un 99,90 %, aproximadamente un 99,94 %, aproximadamente un 99,95 % o aproximadamente un
99,99 %. En la presente invención, el compuesto es 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona. En algunos ejemplos de
referencia descritos en el presente documento, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 2-(1-
hidroxietil)nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-cloronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2-acetil-7-fluoronafto[2,3-b]furan-
4,9-diona, 2-etylnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, éster mono[1-(4,9-dioxo-3a,4,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico]
15 del ácido fosfórico, éster dimetílico y éster 1-(4,9-dioxo-3a,4,9a-tetrahidronafto[2,3-b]furan-2-il)vinílico del ácido
fosfórico, un enantiómero, diastereómero, tautómero y una sal o solvato de estos. En algunos ejemplos de referencia
descritos en el presente documento, el compuesto es un polimorfo de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I. En
algunos ejemplos de referencia, el compuesto de la presente divulgación es un polimorfo del Compuesto 1.
- 20 Las impurezas típicas que pueden estar presentes en un compuesto de la presente invención incluyen una o más
seleccionadas del grupo que consiste en un subproducto, isómero, intermedio y disolvente. En algunas realizaciones,
las impurezas que pueden estar presentes en un compuesto de la presente invención son como máximo
aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 2 % o
aproximadamente un 1 % respecto al compuesto de Fórmula II. En una realización adicional, las impurezas que
25 pueden estar presentes en un compuesto de la presente invención son como máximo aproximadamente un 0,5 %,
aproximadamente un 0,2 %, aproximadamente un 0,15 % o aproximadamente un 0,1 % respecto al compuesto de
Fórmula II. En una realización adicional más, las impurezas que pueden estar presentes en un compuesto de la
30 presente invención son como máximo aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,02 % o aproximadamente
un 0,01 % respecto al compuesto de Fórmula II. En algunas realizaciones, el compuesto sustancialmente puro de
Fórmula II tiene como máximo aproximadamente 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, 0,15, 0,1 o 0 partes por
millón (ppm) de subproducto o subproductos residuales respecto al compuesto de Fórmula II.
- 35 En algunas realizaciones, las impurezas incluyen uno o más subproductos seleccionados del grupo que consiste en
2-acetil-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2,6-diacetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, 2,7-diacetilnafto[2,3-b]furan-
4,9-diona, 3-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona, nafto[2,3-b]furan-4,9-diona, nafto[2,3-b]furan-4,9-diol y 1-(4,9-
dihidroxinafto[2,3-b]furan-2-il)etanona.
- 40 En algunas realizaciones, las impurezas incluyen manganeso (Mn).
- 45 La pureza de un compuesto de la presente invención se puede determinar con varios dispositivos. En algunas
realizaciones, la pureza se determina con HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). En algunas realizaciones,
la pureza se determina con RMN (resonancia magnética nuclear). En una realización adicional, la pureza se determina
con HPLC y RMN.
- 50 Estas composiciones de pureza elevada que contienen el Compuesto 1 exhiben un perfil de seguridad
significativamente mejorado en los experimentos con animales en comparación con composiciones menos puras que
contienen el Compuesto 1. No se han observado signos de ningún efecto adverso del Compuesto 1 de pureza elevada
en ratones. Además, estas composiciones de pureza elevada que contienen el Compuesto 1 se han evaluado en
pacientes y se ha demostrado que tienen una seguridad excepcional. Por ejemplo, la Figura 13 ilustra la toxicidad
55 observada con una composición que tiene una pureza de aproximadamente un 90 % del Compuesto 1, mientras que
la Figura 14 ilustra que las composiciones de pureza elevada que tienen una pureza de aproximadamente un 95 % o
superior del Compuesto 1 son seguras y eficaces. En el estudio que se muestra en la Figura 13, ratones
inmunodeprimidos con cáncer de cabeza y cuello humano FaDu subcutáneo establecido (panel superior) o cáncer de
mama humano MDA-231 (panel inferior) recibieron la cantidad indicada del Compuesto 1 o control de vehículo por vía
60 oral (po). El Compuesto 1 se formuló en GELUCIRE™. Todos los regímenes se administraron a diario (qd). Los pesos
corporales se evaluaron periódicamente durante el tratamiento. Cada punto representa la media ± EEM de ocho
tumores. Se observó una toxicidad significativa con el Compuesto 1 que tenía una pureza de aproximadamente un 90
%. Un total de 4 ratones fallecieron durante el tratamiento en el primer experimento (panel superior) (uno el día 16, 2
el día 19 y 1 el día 23), y sus pesos corporales, por lo tanto, no se incluyeron en la gráfica después de su fallecimiento.
- 65 Un total de 3 ratones fallecieron durante el tratamiento en el segundo experimento (panel superior) (1 el día 14 y 2 el
día 21), y sus pesos corporales, por lo tanto, no se incluyeron en la gráfica después de su fallecimiento. En el estudio
que se muestra en la Figura 14, ratones inmunodeprimidos con cáncer de cabeza y cuello humano FaDu subcutáneo
establecido (panel superior) o cáncer de mama humano MDA-231 (panel inferior) recibieron la cantidad indicada del
Compuesto 1 o control de vehículo por vía oral (po). El Compuesto 1 se formuló en GELUCIRE™. Todos los regímenes
se administraron a diario (qd). Los pesos corporales se evaluaron periódicamente durante el tratamiento. Cada punto
representa la media ± EEM de ocho tumores. El Compuesto 1 con una pureza más elevada fue bien tolerado y no

mostró signos de toxicidad. Todos los ratones permanecieron sanos durante todo el tratamiento en ambos experimentos. En un estudio de Fase I, la dosis del Compuesto 1 se escaló de 20 mg a 2000 mg/día, y no se alcanzó la dosis máxima tolerada (DMT). No se observó toxicidad limitante de la dosis. Los pacientes toleraron el Compuesto 1 muy bien sin efectos adversos inducidos por el fármaco, lo que contrasta enormemente con los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. El perfil de seguridad clínica de las composiciones sustancialmente puras del Compuesto 1 se encuentra entre los mejores de la historia para fármacos oncológicos.

Formulaciones farmacéuticas

10 Se observó que ciertos excipientes o potenciadores mejoran la biodisponibilidad oral de las partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I de una distribución dada de tamaño de partícula en una formulación farmacéutica. Por ejemplo, la adición del excipiente farmacéuticamente compatible GELUCIRE™ 44/14 (un laurato de glicerilo y polietilenglicol producido por Gattefossé) puede aumentar la biodisponibilidad del Compuesto 1 que tiene una mediana de tamaño de partícula inferior o igual a aproximadamente 20 micras. Algunos ejemplos de otros excipientes que se 15 pueden utilizar para mejorar o controlar la biodisponibilidad oral incluyen surfactantes, tales como TWEEN 80™ o TWEEN 20™ (un polisorbato, es decir, un monolaurato de sorbitán polioxietileno), o ciertos lípidos, tales como fosfatidilcolinas, p. ej., dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Los surfactantes incluyen compuestos que son anfifílicos y contienen grupos tanto hidrófobos como hidrófilos. Otros excipientes pueden incluir, por ejemplo, un éster de glicerol de un ácido graso, un éster de glicerol de un ácido graso saturado, un éster de glicerol de un ácido graso saturado 20 que tiene 8 a 18 carbonos, laurato de glicerilo, polietilenglicol, un alquilato de sorbitán polioxietileno, celulosa o derivados de celulosa, tales como celulosa microcristalina y la carboximetilcelulosa (CMC), así como lípidos, tales como esteroles, p. ej., colesterol. Otros excipientes pueden incluir antioxidantes, tales como la vitamina E. En una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se pueden incluir otros excipientes y componentes adicionales, como apreciará un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden incluir otros agentes activos, vehículos 25 estándar, portadores, portadores líquidos, solución salina, soluciones acuosas, diluyentes, agentes tensioactivos, agentes dispersantes, diluyentes inertes, agentes granulantes y desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, deslizantes, agentes de descarga, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, conservantes, composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina, vehículos y disolventes acuosos, vehículos y disolventes oleosos, agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, agentes de suspensión, 30 agentes emulsionantes, emolientes, tampones, sales, agentes espesantes, gelatinas, rellenos, agentes emulsionantes, antioxidantes, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes estabilizantes, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes retardantes de la cristalización (p. ej., para retardar la cristalización de un azúcar), almidones, azúcares, sacarosa, agentes tensioactivos, agentes para aumentar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, tales como un alcohol polihidroxílico, por ejemplo, glicerol o sorbitol, materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente 35 aceptables, y otros componentes. El agente o los agentes adicionales adecuados para ser añadidos dependerán de la forma farmacéutica (p. ej., solución inyectable, cápsula o pastilla), como apreciará un experto en la técnica.

El compuesto de acuerdo con la Fórmula I se puede formular en «composiciones farmacéuticas». Las realizaciones 40 de acuerdo con la presente invención incluyen varias formas farmacéuticas que incluyen un compuesto, que puede ser útil, por ejemplo, para tratar a un paciente. Por ejemplo, las formas farmacéuticas orales pueden incluir un comprimido, pastilla, cápsula (dura o blanda), comprimido oblongo, polvo, gránulo, suspensión (p. ej., en un vehículo acuoso u oleoso), solución (p. ej., en un vehículo acuoso u oleoso), gel, sobre, pastilla para chupar, gragea, sirope, elixir, emulsión, jarabe, emulsión de aceite en agua o emulsión de agua en aceite. Debido a la facilidad de su administración, los comprimidos y las cápsulas pueden representar una dosificación oral preferida. Las formas farmacéuticas orales sólidas se pueden recubrir con azúcar o con un recubrimiento entérico mediante técnicas 45 estándar. Por ejemplo, las formulaciones de pulverización nasal y de otras mucosas (p. ej., formas inhalables) pueden incluir soluciones acuosas purificadas de los compuestos activos con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferentemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas nasales o de otras mucosas. Como alternativa, pueden adoptar la forma de polvos sólidos finamente divididos suspendidos en 50 un portador gaseoso, de un agente para inhalación o de un aerosol. Tales formulaciones se pueden suministrar mediante cualquier medio o método adecuado, p. ej., mediante un nebulizador, atomizador, inhalador de dosis medidas, o similares. En un ejemplo de referencia, una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación también se puede administrar por vía tópica, por ejemplo, en forma de ungüento, crema o suppositorio. En otro ejemplo de referencia, una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede administrar 55 inyectando un agente para inyección. Por lo tanto, una forma farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede adoptar forma de, por ejemplo, sólido, semisólido, líquido o gas. Las formas farmacéuticas adecuadas de la presente invención incluyen formas farmacéuticas orales. Otras formas farmacéuticas adecuadas, que se describen únicamente como referencia, incluyen, sin carácter limitante, una administración sublingual, mucosa, nasal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, parenteral, transdérmica, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoida, 60 bronquial, linfática e intrauterina, y otras formas farmacéuticas para un suministro sistémico de los principios activos. Un principio activo, por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, puede estar contenido en una formulación que proporcione una liberación rápida, liberación sostenida, liberación retardada o cualquier otro perfil de liberación conocido por un experto en la técnica después de la administración a un sujeto (paciente). El modo de administración 65 y la forma farmacéutica que se seleccionan para un tratamiento determinado están estrechamente relacionados con las cantidades terapéuticas de los compuestos o composiciones que son deseables y eficaces para la aplicación determinada del tratamiento, así como factores tales como el estado mental y la condición física del sujeto (paciente).

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o vender a granel, como una dosis unitaria individual, como una pluralidad de dosis unitarias individuales o en forma de múltiples dosis. Tal como se utiliza en el presente documento, una «dosis unitaria» es una cantidad aislada de la composición farmacéutica que incluye una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo en cada dosis unitaria es generalmente igual a la cantidad total del principio activo que se administraría o a una fracción conveniente de una cantidad total de dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de tal dosificación. Una formulación de una composición farmacéutica de la invención adecuada para la administración oral puede adoptar la forma de una unidad de dosificación sólida aislada. Cada unidad de dosificación sólida contiene una cantidad predeterminada del principio activo, por ejemplo, una dosis unitaria o una fracción de esta. Tal como se utiliza en el presente documento, un líquido «oleoso» es uno que incluye un líquido con base de carbono o silicio que es menos polar que el agua. En tales formas farmacéuticas, el agente activo se utiliza preferentemente junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, por lo tanto, y opcionalmente cualesquiera principios terapéuticos adicionales. El (los) portador(es) debe(n) ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no ser excesivamente nocivos para el destinatario de esta. Las composiciones de la presente invención se pueden proporcionar en una forma farmacéutica unitaria, en donde cada unidad de dosificación, p. ej., una cucharadita, comprimido, cápsula, solución o supositorio, contiene una cantidad predeterminada del fármaco activo o profármaco, solo o en una combinación adecuada con otros agentes farmacéuticamente activos. La expresión «forma farmacéutica unitaria» se refiere a las unidades físicamente aisladas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición de la presente invención, sola o en combinación con otros agentes activos, que se calcula en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado.

Las formas farmacéuticas de la presente composición farmacéutica se pueden preparar mediante técnicas conocidas en la materia y contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o principio activo. Se puede utilizar cualquier técnica conocida o que se expone más adelante en el presente documento para la preparación de las formulaciones o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. En general, la preparación incluye asociar el principio activo con un portador o uno o más componentes adicionales diferentes y a continuación, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una unidad deseada de dosis individual o de múltiples dosis. Las formulaciones en polvo y granulares de acuerdo con la invención se pueden preparar utilizando métodos conocidos o métodos que se han de desarrollar. Tales formulaciones se pueden administrar directamente a un sujeto, o se pueden utilizar, por ejemplo, para formar comprimidos, cápsulas rellenas, o para preparar una suspensión o solución acuosa u oleosa mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso a estas. Un comprimido se puede preparar mediante compresión o moldeo, o mediante una granulación por vía húmeda, opcionalmente con uno o más ingredientes adyuvantes. Los comprimidos prensados se pueden preparar pensando, en un dispositivo adecuado, el principio activo en una forma de flujo libre, tal como un polvo o un preparado granular. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando, en un dispositivo adecuado, una mezcla del principio activo, un portador farmacéuticamente aceptable y al menos suficiente líquido para humedecer la mezcla. Los comprimidos pueden no recubrirse o pueden recubrirse utilizando métodos conocidos en la técnica o métodos que se han de desarrollar. Los comprimidos recubiertos se pueden formular para obtener una desintegración retardada en el tracto gastrointestinal de un sujeto, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento entérico, con lo que se proporcionan de este modo una liberación y absorción sostenidas del principio activo. Los comprimidos pueden incluir además ingredientes para proporcionar un preparado farmacéuticamente elegante y agradable al gusto. Las cápsulas duras que incluyen el principio activo se pueden preparar utilizando una composición fisiológicamente degradable tal como gelatina. Tales cápsulas duras incluyen el principio activo. Las cápsulas blandas de gelatina que incluyen el principio activo se pueden preparar utilizando una composición fisiológicamente degradable tal como gelatina. Tales cápsulas blandas incluyen el principio activo, que se puede mezclar con agua o un medio oleoso. Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la invención adecuadas para la administración se pueden preparar, envasar y vender tanto en forma líquida como en forma de un producto seco que se ha de reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Las suspensiones líquidas, en las que el principio activo se dispersa en un vehículo acuoso u oleoso, y las soluciones líquidas, en las que el principio activo se disuelve en un vehículo acuoso u oleoso, se pueden preparar utilizando métodos convencionales o métodos que se han de desarrollar. La suspensión líquida del principio activo puede ser en un vehículo acuoso u oleoso. Las soluciones líquidas del principio activo pueden ser en un vehículo acuoso u oleoso. Para preparar tales formas farmacéuticas, se puede mezclar un principio activo, p. ej., un naftofurano, completamente con un portador farmacéutico de acuerdo con técnicas farmacéuticas convencionales de formulación magistral. El portador puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma del preparado que se deseé para la administración. Al preparar las composiciones en forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales.

En algunos ejemplos descritos en el presente documento, un artículo de fabricación incluye un envase que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye un compuesto de acuerdo con la Fórmula I. El envase puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable. El envase puede incluir instrucciones en una etiqueta impresa. Por ejemplo, la etiqueta impresa puede indicar la dosificación y frecuencia con las que se debe administrar la composición farmacéutica, y si la composición se debería administrar con alimentos o dentro de un período definido de tiempo antes o después de la ingesta de alimentos. La composición puede estar contenida en cualquier envase adecuado capaz de conservar y dispensar la forma farmacéutica que no interaccionará

significativamente con la composición. Las instrucciones de la etiqueta pueden ser coherentes con los métodos de tratamiento que se describen en el presente documento. La etiqueta se puede asociar al envase mediante un medio que mantenga una proximidad física de ambos. A modo de ejemplo no limitante, el envase y la etiqueta pueden estar ambos contenidos en un material de embalaje, tal como una caja o una envoltura retráctil de plástico, o pueden estar asociados estando las instrucciones unidas al envase, como con un pegamento que no oscurezca las instrucciones de la etiqueta u otros medios de unión o adhesión.

Procesos para preparar formulaciones farmacéuticas con una distribución seleccionada de tamaño de partícula y para identificar una distribución óptima de tamaño de partícula

Procesos de molienda

En un método descrito en el presente documento, se puede utilizar un proceso de molienda o trituración para reducir el tamaño de las partículas de un principio activo o un compuesto de acuerdo con la Fórmula I. Por ejemplo, un proceso de molienda o trituración puede ser adecuado para producir partículas que tengan una mediana de tamaño de 200 µm, 150 µm, 100 µm, 40 µm, 20 µm, 5 µm, 2 µm o un tamaño mayor o menor. Tal proceso de molienda o trituración puede incluir, por ejemplo, una molienda con un molino de bolas, molino de rodillos, molino de chorro, una molienda por vía húmeda, una molienda ultrasónica, trituración y combinaciones de estas. Por ejemplo, el proceso puede reducir el tamaño de las partículas haciendo colisionar las partículas con una superficie dura, o sometiendo las partículas a una presión elevada, p. ej., presionando una partícula entre dos superficies. Por ejemplo, en una molienda con un molino de chorro, una corriente de gas arrastra partículas y las acelera a velocidades elevadas. A continuación, las partículas colisionan con otras partículas y paredes y se fracturan en partículas más pequeñas. Por ejemplo, en una molienda por vía húmeda, las partículas se combinan con un líquido, y la suspensión resultante se hace pasar a través de un mezclador de alto cizallamiento para fracturar las partículas. Por ejemplo, en una molienda ultrasónica, las partículas, por ejemplo, en una suspensión, se exponen a una radiación ultrasónica. La cavitación inducida por el ultrasonido puede fracturar las partículas en partículas de menor tamaño.

Puede resultar ventajoso reducir la temperatura de las partículas antes de someterlas a la operación de molienda o trituración. Por ejemplo, la temperatura se puede reducir hasta una temperatura criogénica, p. ej., exponiendo las partículas a o sumergiendo las partículas en un fluido criogénico tal como nitrógeno líquido. Tal reducción de la temperatura puede hacer que las partículas sean más quebradizas y más propensas a que se reduzca su tamaño en la operación de molienda o trituración. Después del proceso de molienda o trituración, se puede utilizar un proceso de selección, tal como un tamizado, para estrechar el intervalo de tamaños de las partículas.

Proceso de cristalización

La cristalización es el principal paso de separación y purificación para la fabricación de sustancias farmacológicas. La cristalización también se puede utilizar para controlar el tamaño de las partículas. La distribución del tamaño de partícula (DTP) obtenida durante la cristalización se ve influenciada por una combinación de varios mecanismos que ocurren durante la cristalización, tales como nucleación, crecimiento, agregación, desgaste, rotura, etc. El control de la DTP durante la cristalización es fundamental para lograr las propiedades deseadas del producto. Cuando el tamaño de partícula no se puede controlar de manera sistemática durante la cristalización para cumplir con las especificaciones deseadas, se puede incluir un paso de procesamiento adicional, tal como una molienda por vía seca. (Braat, *et al.* *Crystallization: Particle Size Control, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*: Tercera edición, publicado el 02 de octubre de 2006)

Métodos para el tratamiento del cáncer

Un método relacionado con la presente invención para el tratamiento, el retraso de la progresión, la prevención de una recaída, el alivio de un síntoma o la mejora de otro modo de un sujeto humano afectado por una neoplasia incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye partículas de una distribución de tamaño predeterminada, por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la Fórmula I tal como el Compuesto 1, un compuesto puro, un producto puro y/o una composición farmacéutica pura, de modo que el crecimiento volumétrico de la neoplasia se ralentiza, el crecimiento volumétrico de la neoplasia se detiene, la neoplasia disminuye en volumen y/o se destruye una neoplasia cancerosa. Algunos ejemplos de tipos de neoplasias que pueden ser sensibles al tratamiento con este método incluyen tumores sólidos, tumores malignos, cánceres, tumores metastásicos, neoplasias que incluyen células madre cancerosas, neoplasias en las que está implicada la vía de STAT3, carcinomas y sarcomas. Una lista no exhaustiva de cánceres que pueden ser sensibles al tratamiento mediante la administración de partículas de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I incluye los siguientes: cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma, cáncer de hígado, tumor cerebral, leucemia, mieloma múltiple, cáncer gástrico y linfoma. La vía de STAT3 puede estar involucrada en estos cánceres. Una lista no exhaustiva de cánceres que pueden ser sensibles al tratamiento mediante la administración de partículas de, por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la Fórmula I incluye los siguientes: cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, melanoma y meduloblastoma. La vía de las CMC puede estar involucrada en estos cánceres. Una lista no exhaustiva de otros cánceres que pueden ser sensibles al tratamiento mediante la administración de partículas de, por ejemplo, un

compuesto de acuerdo con la Fórmula I incluye los siguientes: cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, glioma, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de vías biliares, cáncer de huesos, cáncer ocular (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de hipófisis, cáncer rectal, cáncer de las glándulas salivales y cáncer nasofaríngeo.

Células madre cancerosas

En los últimos años, un nuevo modelo de tumorigénesis ha ganado una amplia aceptación, donde se plantea la hipótesis de que solo una pequeña fracción de toda la masa tumoral es responsable de las actividades tumorigénicas dentro del tumor, mientras que el modelo genético antiguo o clonal postula que todas las células tumorales mutadas contribuyen por igual a tales actividades tumorales. Esta pequeña fracción de células tumorigénicas, según el nuevo modelo, son células transformadas con cualidades similares a las de las células madre y se denominan «células madre cancerosas» (CMC). Bonnet y Dick demostraron por primera vez, *in vivo*, la presencia de CMC en la leucemia mieloide aguda (LMA) durante la década de los noventa. Sus datos mostraron que solo una pequeña subpoblación de células de LMA humanas tenían la capacidad de transferir LMA cuando se trasplantaban a ratones inmunodeprimidos, mientras que otras células de LMA eran incapaces de inducir leucemia. Más tarde, se demostró que estas CMC tenían los mismos marcadores celulares, CD34+/CD38-, que las células madre hematopoyéticas primitivas. (Bonnet, D., «Normal and leukaemic stem cells». *Br J Haematol*, 2005. 130(4): págs. 469-79). Desde entonces, los investigadores han encontrado CMC concluyentemente en varios tipos de tumores que incluyen los de cerebro, mama, piel, próstata, cáncer colorrectal, etc.

El modelo de tumorigénesis de CMC explicaría por qué deben inyectarse decenas o cientos de miles de células tumorales en un animal de experimentación para establecer un trasplante tumoral. En la LMA humana, la frecuencia de estas células es inferior a 1 de cada 10 000. (Bonnet, D. y J.E. Dick, «Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell». *Nat Med*, 1997. 3(7): págs. 730-7). A pesar de que son poco frecuentes dentro de una población determinada de células tumorales, hay cada vez más evidencias de que tales células existen en casi todos los tipos de tumores. Sin embargo, como las líneas de células cancerosas se seleccionan a partir de una subpoblación de células cancerosas que están adaptadas específicamente para crecer en un cultivo tisular, las propiedades biológicas y funcionales de las líneas de células cancerosas pueden experimentar cambios dramáticos. Por lo tanto, no todas las líneas de células cancerosas contienen CMC.

Las células madre cancerosas comparten muchos rasgos similares con las células madre normales. Por ejemplo, las CMC tienen capacidad de autorrenovación, es decir, la capacidad de dar lugar a células madre cancerosas tumorigénicas adicionales, normalmente a un ritmo más lento que otras células tumorales en división, en lugar de un número limitado de divisiones. Las CMC también tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, lo que explicaría la evidencia histológica de que no solo muchos tumores contienen múltiples tipos de células nativas del órgano hospedador, sino que también la heterogeneidad se retiene habitualmente en las metástasis tumorales. Se ha demostrado que las CMC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la recidiva del cáncer. Las CMC también se denominan células iniciadoras de tumores, células similares a las células madre cancerosas, células cancerosas similares a las células madre, células altamente tumorigénicas, células madre tumorales, células madre de tumores sólidos o células supermaligñas.

La existencia de células madre cancerosas tiene implicaciones fundamentales para futuros tratamientos y terapias contra el cáncer. Estas implicaciones se manifiestan en la identificación de enfermedades, el direccionamiento selectivo de fármacos, la prevención de la metástasis y la recidiva del cáncer y el desarrollo de nuevas estrategias para combatir el cáncer.

La eficacia de los tratamientos actuales contra el cáncer a menudo se mide, en las etapas iniciales de las pruebas, según el tamaño de la contracción del tumor, es decir, la cantidad de masa tumoral que se elimina. Como las CMC formarían una proporción muy pequeña del tumor y tienen unas características biológicas significativamente diferentes a las de sus progenies más diferenciadas, la medición de la masa tumoral puede no seleccionar necesariamente fármacos que actúen específicamente sobre las células madre. De hecho, parece ser que las células madre cancerosas son resistentes a la radioterapia (XRT) y también son refractarias a los fármacos quimioterapéuticos y dirigidos. (Hambardzumyan, D., M. Squatrito y E.C. Holland, «Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors». *Cancer Cell*, 2006. 10(6): págs. 454-6; Baumann, M., M. Krause, y R. Hill, «Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance». *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(7): págs. 545-54; Ailles, L.E. e I.L. Weissman, «Cancer stem cells in solid tumors». *Curr Opin Biotechnol*, 2007. 18(5): págs. 460-6). Las células madre somáticas normales son resistentes de forma natural a los agentes quimioterapéuticos; disponen de varias bombas (tales como MDR) que bombean los fármacos, y proteínas reparadoras de ADN. Además, también tienen una tasa lenta de recambio celular, mientras que los agentes quimioterapéuticos actúan sobre células que se replican rápidamente. Las células madre cancerosas, que son los homólogos mutados de las células madre normales, también pueden disponer de mecanismos similares que les permiten sobrevivir a las terapias farmacológicas y a los tratamientos de radiación. Dicho de otro modo, las quimioterapias y radioterapias convencionales destruyen las células diferenciadas o en fase de diferenciación, que constituyen la mayor parte del tumor que son incapaces de generar nuevas células madre cancerosas altamente tumorigénicas. Por otro lado, la población de células madre cancerosas que dio lugar a las células diferenciadas y en

fase de diferenciación podría permanecer intacta y provocar una recaída de la enfermedad. Otro peligro de la terapia contra el cáncer convencional es la posibilidad de que el tratamiento quimioterapéutico solo deje células madre cancerosas resistentes a la quimioterapia, y el tumor recidivante resultante probablemente también sea resistente a la quimioterapia.

- 5 Dado que las células madre cancerosas sobrevivientes pueden repoblar el tumor y provocar una recaída, es imperativo que las terapias contra el cáncer incluyan estrategias contra las CMC (véase la Figura 18). Esto es similar a eliminar las raíces para evitar que los dientes de león vuelvan a crecer, incluso si se ha cortado la masa a nivel del suelo de la maleza. (Jones, R.J., W.H. Matsui y B.D. Smith, «Cancer stem cells: are we missing the target?» *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(8): págs. 583-5). Al actuar selectivamente sobre las células madre cancerosas, es posible tratar a pacientes con tumores agresivos no extirpables y cánceres refractarios o recidivantes, así como prevenir la metástasis y la recidiva del tumor. El desarrollo de terapias específicas que actúan sobre las células madre cancerosas puede mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con cáncer, especialmente para los que padecen cánceres metastásicos. La clave para desatar este potencial no explotado es la identificación y validación de vías que sean selectivamente importantes para la autorrenovación y supervivencia de las células madre cancerosas. Desafortunadamente, aunque en el pasado se han dilucidado múltiples vías subyacentes a la tumorigénesis en el cáncer o la autorrenovación en células madre embrionarias y adultas, se han identificado y validado muy pocas vías para la autorrenovación y supervivencia de las células madre cancerosas.
- 10 20 También se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la identificación y el aislamiento de células madre cancerosas. Los métodos utilizados explotan principalmente la capacidad de las CMC para expulsar fármacos, o se basan en la expresión de marcadores superficiales asociados con las células madre cancerosas.
- 15 25 Por ejemplo, dado que las CMC son resistentes a muchos agentes quimioterapéuticos, no es sorprendente que las CMC sobreexpresen casi ubícuamente bombas de expulsión de fármacos tales como ABCG2 (BCRP-1) (Ho, M.M., et al., «Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells». *Cancer Res*, 2007. 67(10): págs. 4827-33; Wang, J., et al., «Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line». *Cancer Res*, 2007. 67(8): págs. 3716-24; Haraguchi, N., et al., «Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system». *Stem Cells*, 2006. 24(3): págs. 506-13; Doyle, L.A. y D.D. Ross, «Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)». *Oncogene*, 2003. 22(47): págs. 7340-58; Alvi, A.J., et al., «Functional and molecular characterisation of mammary side population cells». *Breast Cancer Res*, 2003. 5(1): págs. R1-8) y otros miembros de la superfamilia de cassettes de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés) (Frank, N.Y., et al., «ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma». *Cancer Res*, 2005. 65(10): págs. 4320-33; Schatton, T., et al., «Identification of cells initiating human melanomas». *Nature*, 2008. 451(7176): págs. 345-9). En consecuencia, la técnica de población lateral (SP, por sus siglas en inglés), utilizada originalmente para enriquecer células madre hematopoyéticas y leucémicas, también se ha empleado para identificar y aislar CMC. (Kondo, T., T. Setoguchi y T. Taga, «Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line». *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(3): págs. 781-6). Esta técnica, descrita por primera vez por Goodell *et al.*, aprovecha el eflujo diferencial dependiente del transportador de ABC tal como Hoechst 33342 para definir y aislar una población celular enriquecida en CMC (Doyle, L.A. y D.D. Ross, «Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)». *Oncogene*, 2003. 22(47): págs. 7340-58; Goodell, M.A., et al., «Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo». *J Exp Med*, 1996. 183(4): págs. 1797-806). Específicamente, la SP se revela bloqueando el eflujo de fármaco con verapamilo, momento en el que los tintes ya no pueden ser bombeados fuera de la SP.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 Los investigadores también se han centrado en encontrar marcadores específicos que diferencien las células madre cancerosas de la masa del tumor. Los marcadores superficiales más comúnmente expresados por las células madre cancerosas incluyen CD44, CD133 y CD166. (Collins, A.T., et al., «Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells». *Cancer Res*, 2005. 65(23): págs. 10946-51; Li, C., et al., «Identification of pancreatic cancer stem cells». *Cancer Res*, 2007. 67(3): págs. 1030-7; Ma, S., et al., «Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells». *Gastroenterology*, 2007. 132(7): págs. 2542-56; Prince, M.E., et al., «Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma». *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(3): págs. 973-8; Ricci-Vitiani, L., et al., «Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells». *Nature*, 2007. 445(7123): págs. 111-5; Singh, S.K., et al., «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors». *Cancer Res*, 2003. 63(18): págs. 5821-8; Dalerba, P., et al., «Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells». *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(24): págs. 10158-63). La clasificación de las células tumorales basada principalmente en la expresión diferencial de estos marcadores superficiales ha identificado la mayoría de las CMC altamente tumorigénicas descritas hasta la fecha. Por lo tanto, estos marcadores superficiales están bien validados para la identificación y el aislamiento de las células madre cancerosas a partir de las líneas de células cancerosas y de la masa de los tejidos tumorales.
- 70 75 80 85 90 Estudios recientes han descubierto la presencia de células madre cancerosas (CMC) con una capacidad exclusiva para regenerar tumores. Estas CMC existen en casi todos los tipos de tumores y están funcionalmente relacionadas con el crecimiento maligno continuado, la metástasis del cáncer, la recidiva y la resistencia a fármacos contra el cáncer. Al parecer las CMC y su progenie más diferenciadas tienen unas características biológicas significativamente

5 diferentes. Los cribados de fármacos contra el cáncer convencionales dependen de la medición de la cantidad de masa tumoral, por lo tanto, es posible que no necesariamente seleccionen fármacos que actúen específicamente sobre las CMC. De hecho, se ha demostrado que las CMC son resistentes a las quimioterapias y radioterapia estándar, y que se enriquecen después de los tratamientos contra el cáncer estándar, lo que da como resultado un cáncer refractario y recidivante. Los métodos para aislar estas células incluyen, sin carácter limitante, la identificación según su capacidad para efluir Hoechst 33342, la identificación según los marcadores superficiales que estas células expresan, tales como CD133, CD44, CD166 y otros, y el enriquecimiento según su propiedad tumorigénica. Las evidencias cada vez mayores que vinculan las células madre cancerosas con la tumorigénesis ponen de manifiesto la enorme oportunidad terapéutica de actuar sobre las células madre cancerosas.

10 Los datos proporcionados en el presente documento, combinados con avances recientes en la investigación sobre CMC, permiten que la presente invención se relacione con una gama de métodos dirigidos a la inhibición de CMC, métodos dirigidos a la inhibición de tanto CMC como células cancerosas heterogéneas, y métodos de tratamiento de cánceres que tienen CMC en particular o cánceres en general. En el presente documento también se describen 15 métodos relacionados (p. ej., fabricación y cribado de candidatos a fármacos), materiales, composiciones y kits. El método puede evitar que las CMC se autorrenueven, de tal manera que ya no sean capaces de reponer sus números dividiéndose en células CMC tumorigénicas. O bien, el método puede inducir la muerte celular en CMC, o en tanto CMC como células cancerosas heterogéneas.

20 Este método se puede utilizar para tratar el cáncer de un sujeto. Los cánceres que son buenos candidatos para tal tratamiento incluyen, sin carácter limitante: cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma colorrectal, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cáncer de cuello uterino, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia, y linfomas. En algunas realizaciones, el método se utiliza para tratar cánceres de hígado, cánceres de 25 cabeza y cuello, cánceres de páncreas y/o cánceres gástricos. En algunas realizaciones, el método se utiliza para tratar mieloma múltiple, tumores cerebrales y sarcomas.

30 Además, como se ha demostrado que las CMC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reaparición del cáncer, cualesquiera métodos relacionados con la invención dirigidos a la inhibición de las CMC, o tanto las CMC como las células cancerosas heterogéneas, se pueden poner en práctica para tratar un cáncer que sea metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, o que haya reaparecido en el sujeto después de un tratamiento inicial.

35 En algunos ejemplos descritos en el presente documento, el inhibidor de células madre del cáncer es: un compuesto de Fórmula 1.

40 En el presente documento también se describe un método para identificar un candidato a fármaco capaz de inhibir una célula madre cancerosa. El candidato a fármaco puede ser capaz de inducir la muerte celular en CMC o al menos inhibir su autorrenovación. El candidato a fármaco puede ser capaz de inducir la muerte celular en CMC o al menos inhibir su autorrenovación, e inducir la muerte celular en células cancerosas heterogéneas. Para cribar el candidato a fármaco, se pueden tener como diana varias fases de la vía.

45 En consecuencia, el Compuesto de la invención se utiliza para formular una composición farmacéutica para tratar o prevenir trastornos o afecciones. Los trastornos son cánceres e incluyen, sin carácter limitante: varios tipos de cánceres de mama, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres de ovario, cánceres de páncreas, carcinoma colorrectal, cánceres de próstata, carcinoma de células renales, melanoma, carcinomas hepatocelulares, cánceres de cuello uterino, sarcomas, tumores cerebrales, cánceres gástricos, mieloma múltiple, leucemia y linfomas.

50 En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método de inhibición de células madre cancerosas donde se administra una cantidad eficaz del Compuesto de la invención a las células. Los cánceres que se sabe que tienen CMC son buenos candidatos para tales tratamientos e incluyen, sin carácter limitante: varios tipos de cánceres de mama, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de pulmón, cánceres de ovario, cánceres de páncreas, adenocarcinoma colorrectal, cánceres de próstata, cánceres de hígado, melanoma, mieloma múltiple, tumores cerebrales, sarcomas, meduloblastoma y leucemia.

55 Además, como se ha demostrado que las CMC son fundamentalmente responsables de la tumorigénesis, la metástasis del cáncer y la reaparición del cáncer, cualesquiera métodos relacionados con la invención dirigidos a la inhibición de las CMC se pueden poner en práctica para tratar un cáncer que sea metastásico, refractario a una quimioterapia o radioterapia, o que haya reaparecido en el sujeto después de un tratamiento inicial.

60 En algunas realizaciones, el cáncer que se está tratando se selecciona del siguiente grupo: cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer renal, sarcoma, mieloma múltiple, cáncer de mama metastásico, cáncer de próstata metastásico, leucemia, linfoma, cáncer de esófago pancreático, tumor cerebral, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de vías biliares, cáncer de huesos, cáncer ocular (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de hipofisis, cáncer rectal, cáncer de glándulas salivales y cáncer nasofaríngeo.

- En un aspecto, la presente invención se refiere al Compuesto de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, donde se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye el Compuesto de la invención. El cáncer puede ser metastásico. El sujeto es un mamífero que es un ser humano.
- El tratamiento mediante la administración de partículas de, por ejemplo, un compuesto de acuerdo con la Fórmula I a un sujeto (paciente) que padece una neoplasia puede estar indicado para las siguientes afecciones. La neoplasia puede ser refractaria al tratamiento con quimioterapia, radioterapia o terapia hormonal. La neoplasia puede no ser apta para resección quirúrgica. La neoplasia puede haber reaparecido en el sujeto (paciente). Las células madre cancerosas se han implicado en la recidiva de las neoplasias; la destrucción de las células madre cancerosas o la inhibición de su autorrenovación mediante un método relacionado con la presente invención puede evitar que la neoplasia se regenere a sí misma. El tratamiento mediante la administración de partículas de naftofurano puede retrasar o detener el crecimiento volumétrico de una neoplasia o disminuir el volumen de una neoplasia, por ejemplo, induciendo la muerte, inhibiendo el crecimiento y/o la división y/o destruyendo selectivamente las células neoplásicas. Por ejemplo, un tratamiento relacionado con la presente invención puede inducir la muerte celular de una célula de la neoplasia. Por ejemplo, el tratamiento puede actuar inhibiendo la vía de STAT3 de una célula neoplásica.
- El tratamiento mediante la administración de partículas de, por ejemplo, un Compuesto de la invención a un sujeto (paciente) que padece una neoplasia se puede utilizar para prevenir la recaída de una neoplasia y/o como terapia adyuvante a la resección quirúrgica.
- Una composición farmacéutica que incluye partículas de, por ejemplo, un Compuesto de la invención se administra por vía oral, ya que esta es una forma conveniente de tratamiento. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar por vía oral no más de cuatro veces al día. Como alternativa, que se describe únicamente como referencia, hay el caso en donde la composición farmacéutica se puede administrar por vía intravenosa o intraperitoneal.
- En un método descrito en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención puede ser una dosis diaria total en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 2000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1500 mg, de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 1400 mg, o de aproximadamente 180 mg a 1200 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención es una dosis diaria total en el intervalo de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1500 mg, o de aproximadamente 360 mg a 1200 mg. En el compuesto para el uso de la presente invención, el método comprende la administración del compuesto con una dosis diaria total en un intervalo de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 1000 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención es una dosis diaria total en el intervalo de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1000 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención es una dosis diaria total de aproximadamente 1000 mg.
- En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en una sola dosis diaria. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en una sola dosis diaria en un intervalo de aproximadamente 20 mg QD a aproximadamente 2000 mg QD. En algunos ejemplos descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en una sola dosis diaria en un intervalo de aproximadamente 160 mg QD a aproximadamente 1000 mg QD.
- En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en más de una dosis diaria. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 160 mg a 1400 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 320 mg a 1200 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 400 mg a 1000 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde la dosis diaria total es de aproximadamente 1000 mg.

En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 80 mg a 1000 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz

5 de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 160 mg a 600 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 500 mg. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un

10 Compuesto de la invención se administra en dos dosis diarias, donde cada dosis es de aproximadamente 500 mg.

En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en tres dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 240 mg a aproximadamente 1500 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un

15 Compuesto de la invención se administra en tres dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 480 mg a aproximadamente 1500 mg.

20 En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administra en tres dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 80 mg a 500 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un

25 Compuesto de la invención se administra en tres dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de 160 mg a 1500 mg.

30 Un Compuesto de la invención o una composición farmacéutica de este se puede administrar a través de una vía cualquiera o a través de una combinación de vías, por ejemplo, vía oral, intravenosa o intraperitoneal. En la invención, un Compuesto de la invención se administra por vía oral. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar por vía oral en una formulación que incluye Gelucire y Tween 80.

35 Un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto, p. ej., un paciente, en el intervalo de al menos aproximadamente 0,002 μ M a aproximadamente

30 μ M durante un tiempo de al menos 2 horas a no más de 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto en el intervalo de al menos aproximadamente 0,2 μ M a aproximadamente 1 μ M durante un tiempo de al menos 2 horas a no más de 24 horas, igual o superior a aproximadamente 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M, 2,5 μ M, 3,0 μ M, 4,0 μ M, 5,0 μ M, 6,0 μ M, 7,0 μ M, 8,0 μ M, 9,0 μ M, 10,0 μ M, 15,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas.

40 En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto igual o superior a aproximadamente 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M, 3,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M, 15,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto igual o superior a aproximadamente 2,0 μ M, 3,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24

45 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto igual o superior a aproximadamente 3,0 μ M o 5,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas.

50 Un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto, p. ej., un paciente, en el intervalo de al menos aproximadamente 0,002 μ M.h a aproximadamente 300 μ M.h en 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir un área bajo la curva en 24 horas (AUC24) en un sujeto igual o superior a

55 aproximadamente 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M, 2,5 μ M, 3,0 μ M, 4,0 μ M, 5,0 μ M, 6,0 μ M, 7,0 μ M, 8,0 μ M, 9,0 μ M, 10,0 μ M, 15,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto igual o superior a aproximadamente 1,0 μ M, 1,5 μ M, 2,0 μ M, 3,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M, 15,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto igual o superior a

60 aproximadamente 2,0 μ M, 3,0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto igual o superior a aproximadamente 3,0 μ M o 5,0 μ M durante al menos 2 horas y menos de 24 horas. En algunas realizaciones, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir un área bajo la curva en 24 horas (AUC_{0-24h}) en un sujeto igual o superior a aproximadamente 2 μ M*h, 10 μ M*h, 20 μ M*h, 30 μ M*h, 40 μ M*h, 50 μ M*h, 60 μ M*h, 70 μ M*h, 80 μ M*h, 90 μ M*h, 100 μ M*h, 125 μ M*h, 150 μ M*h,

65 200 μ M*h, 250 μ M*h, 300 μ M*h, 400 μ M*h y 500 μ M*h.

Si la condición del sujeto (paciente) así lo requiere, las dosis de la composición farmacéutica se pueden administrar como una infusión continua o pulsátil. La duración de un tratamiento puede ser de décadas, años, meses, semanas o días, mientras los beneficios persistan. Los intervalos anteriores se proporcionan únicamente como directrices y están sujetos a optimización.

- 5 En un método relacionado con la invención, las células de la neoplasia se destruyen selectivamente mediante la administración de la composición farmacéutica, de modo que la concentración molar en sangre del compuesto es al menos una concentración eficaz e inferior a una concentración dañina durante un primer período de tiempo continuo que es al menos tan largo como un período de tiempo eficaz y más corto que un período de tiempo dañino. La concentración molar en sangre puede ser inferior a la concentración eficaz después del primer período de tiempo continuo. La concentración eficaz puede ser una concentración suficientemente alta, de modo que las células neoplásicas, p. ej., las células cancerosas, sean destruidas. El período de tiempo eficaz puede ser lo suficientemente largo, de modo que las células neoplásicas, p. ej., las células cancerosas, sean destruidas. La concentración dañina puede ser una concentración en la que las células normales se dañen o destruyen. El período de tiempo dañino puede ser un período de tiempo lo suficientemente largo para que las células normales se dañen o destruyen. Por ejemplo, la concentración eficaz puede ser igual o superior a aproximadamente 0,02 μ M, aproximadamente 0,05 μ M, aproximadamente 0,1 μ M, aproximadamente 0,2 μ M, aproximadamente 0,5 μ M, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 10 μ M o aproximadamente 20 μ M. Por ejemplo, la concentración no dañina puede ser igual o inferior a aproximadamente 3 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 14 μ M, aproximadamente 30 μ M o aproximadamente 100 μ M. Por ejemplo, el período de tiempo eficaz puede ser igual o superior a aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o aproximadamente 48 horas. Por ejemplo, para conseguir una exposición no dañina para las células normales, la concentración de fármaco del Compuesto 1 debe eliminarse sustancialmente de la sangre en aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas. «Eliminar sustancialmente de la sangre» significa que la concentración de fármaco en sangre disminuye en al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %. Por ejemplo, una concentración eficaz puede ser una concentración que excede el valor de IC_{50} de las células cancerosas cuando el compuesto se administra durante cierto período de tiempo. Por ejemplo, un período de tiempo eficaz puede ser un período de tiempo durante el cual las células cancerosas se inhiben o destruyen selectivamente cuando el compuesto se administra al menos con la concentración eficaz. Por ejemplo, una concentración dañina puede ser una concentración que excede el valor de IC_{50} de las células normales cuando el compuesto se administra durante cualquier período de tiempo. Por ejemplo, un período de tiempo dañino puede ser un período de tiempo durante el cual las células normales así como las células cancerosas se inhiben o destruyen cuando el compuesto se administra con la concentración eficaz.
- 35 Un experto en la técnica puede administrar la composición farmacéutica seleccionando la cantidad y frecuencia de la dosificación para conseguir un «perfil farmacocinético selectivo» (PFS) descrito en el presente documento que se considera necesario para destruir selectivamente las células neoplásicas, tales como las células cancerosas, y preservar las células normales. Tal consideración del PFS también puede guiar el diseño de la composición farmacéutica, por ejemplo, la distribución de tamaño de partícula y la distribución de las formas de las partículas.

- 40 En un método relacionado con la invención, la composición farmacéutica se administra por vía oral en una forma farmacéutica tal como un comprimido, pastilla, cápsula (dura o blanda), comprimido oblongo, polvo, gránulo, suspensión, solución, gel, sobre, pastilla para chupar, gragea, sirope, elixir, emulsión, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite o jarabe.

Identificación de una distribución óptima de tamaño de partícula

- 45 En un método relacionado con la invención, una distribución óptima de tamaño de partícula de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I, el Compuesto 1 y/o una forma sustancialmente pura del Compuesto 1 para el tratamiento de un ser humano, mamífero o animal afectado por una neoplasia se puede determinar de la siguiente manera. Se puede preparar al menos un conjunto de partículas que incluyen el compuesto. En la preparación del conjunto de partículas, por ejemplo, el tamaño de partícula de una muestra de compuesto sólido se puede reducir, por ejemplo, disolviendo el compuesto y nebulizando la solución, disolviendo el compuesto y sonicando la solución, moliendo el compuesto sólido con un molino de bolas, moliendo el compuesto sólido con un molino de rodillos, triturando el compuesto sólido y/o tamizando el compuesto sólido. La distribución de tamaño de partícula de al menos un conjunto de partículas se puede determinar mediante un método o una combinación de métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, la distribución de tamaño de partícula se puede determinar utilizando una técnica tal como el análisis por tamizado, el recuento microscópico óptico, el recuento de micrografías electrónicas, el recuento de la electrorresistencia, el tiempo de sedimentación, difracción láser, espectroscopía acústica, otra técnica o una combinación de técnicas. Se puede administrar dicho al menos un conjunto de partículas a las células neoplásicas y a las células normales con una concentración predeterminada y durante un período de tiempo predeterminado. Se puede observar el efecto de las partículas sobre el metabolismo, la división y/u otro indicador de la vitalidad de las células neoplásicas y las células normales. El efecto observado de las partículas en las células neoplásicas se puede utilizar para asignar una clasificación de eficacia a cada conjunto de partículas. Por ejemplo, a un conjunto de partículas que inhibe el metabolismo y/o la división de las células neoplásicas, daña o destruye las células neoplásicas, o exhibe

de otra manera una actividad antitumoral elevada se le puede asignar una clasificación de eficacia elevada. El efecto observado de las partículas sobre las células normales se puede utilizar para asignar una clasificación de toxicidad a cada conjunto de partículas. Por ejemplo, a un conjunto de partículas que inhibe el metabolismo y/o la división de las células normales o que daña o destruye las células normales o donde las células normales exhiben de otra manera una tolerabilidad baja del conjunto de partículas se le puede asignar una clasificación de toxicidad elevada.

Por ejemplo, el conjunto de partículas se puede administrar a células neoplásicas y células normales *in vitro*. Por ejemplo, la clasificación de eficacia puede ser igual, proporcional o una función que aumenta de forma monótona respecto al valor de IC_{50} de las células neoplásicas. Por ejemplo, la clasificación de toxicidad puede ser igual, proporcional o una función que aumenta de forma monótona respecto al valor de IC_{50} de las células normales.

Por ejemplo, el conjunto de partículas se puede administrar a células neoplásicas y células normales *in vivo* a un animal de prueba. Por ejemplo, el animal de prueba puede ser un mamífero, primate, ratón, rata, cobaya, conejo o perro. Por ejemplo, la clasificación de eficacia puede ser igual, proporcional o una función que aumenta de forma monótona respecto a la disminución en el volumen de las células neoplásicas después de la administración del conjunto de partículas. Por ejemplo, la clasificación de toxicidad puede ser igual, proporcional o una función que aumenta de forma monótona respecto a la disminución en la masa del animal de prueba después de la administración del conjunto de partículas. Por ejemplo, el conjunto de partículas se puede administrar a un ser humano en un estudio clínico. Un método para tratar una neoplasia puede incluir la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjunto de partículas del compuesto de acuerdo con la Fórmula I, el Compuesto 1 y/o una forma sustancialmente pura del Compuesto 1 a un ser humano, mamífero o animal afectado por la neoplasia. Antes de la administración de las partículas del compuesto, el compuesto de acuerdo con la Fórmula I, el Compuesto 1 y/o una forma sustancialmente pura del Compuesto 1 a un animal o un ser humano o a células *in vitro*, las partículas se pueden suspender en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La clasificación de eficacia y/o la clasificación de toxicidad de cada conjunto de partículas que tienen una primera distribución de tamaño de partícula se pueden comparar con la clasificación de eficacia y/o la clasificación de toxicidad de otro conjunto o conjuntos de partículas que tienen una distribución de tamaño de partícula diferente de la primera distribución de tamaño de partícula. Un conjunto de partículas de un compuesto que tiene una clasificación de eficacia elevada y una clasificación de toxicidad baja puede ser eficaz a la hora de inhibir o destruir células neoplásicas, p. ej., células cancerosas, pero no afecta a las células normales. Un experto en la técnica puede seleccionar como conjunto óptimo el conjunto de partículas que tenga una clasificación de eficacia superior, una clasificación de toxicidad inferior y/o una suma ponderada de la clasificación de eficacia y clasificación de toxicidad superior a las de al menos otro conjunto de partículas diferente (por ejemplo, la clasificación de eficacia se puede ponderar con un coeficiente positivo y la clasificación de toxicidad se puede ponderar con un coeficiente negativo). Un experto en la técnica también puede utilizar otros criterios para seleccionar el conjunto óptimo de partículas, por ejemplo, partículas que tengan una suma de la clasificación de eficacia ponderada y la relación ponderada de la clasificación de eficacia por encima de la clasificación de toxicidad. La distribución de tamaño de partícula del conjunto óptimo de partículas se puede considerar una distribución óptima de tamaño de partícula para el compuesto evaluado. La distribución óptima de tamaño de partícula puede ser diferente para un compuesto, p. ej., el Compuesto 1, que para otro compuesto, p. ej., un compuesto de acuerdo con la Fórmula I que no sea el Compuesto 1. La distribución óptima de tamaño de partícula para un determinado compuesto puede diferir cuando se determina mediante la administración a células *in vitro*, a un animal de prueba pequeño y a un animal de prueba grande. Sin embargo, la distribución óptima de tamaño de partícula determinada mediante la administración de un compuesto determinado a un organismo *in vitro* o *in vivo* puede representar un punto de partida racional para optimizar la distribución de tamaño de partícula para otro compuesto o para la administración a otro organismo.

Un conjunto óptimo de partículas del compuesto de acuerdo con la Fórmula I, el Compuesto 1 y/o una forma sustancialmente pura del Compuesto 1 se puede incluir en la composición para reducir o inhibir la replicación o propagación de células neoplásicas.

EJEMPLOS

A continuación, se proporcionan Ejemplos y Ejemplos de referencia para ilustrar adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos también ilustran una metodología útil para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

EJEMPLO 1: Preparación de un compuesto de naftofurano

El procedimiento para la preparación de un compuesto de naftofurano (2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona) se resume de la siguiente manera:

Paso 1: Bromación

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 litros dotado de un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición, se introduce 3-buten-2-ona (451,2 gramos). Se añade bromo (936,0 gramos) al embudo de adición. Después

de que el contenido del matraz se haya enfriado hasta -5 °C, se adiciona el bromo al matraz con agitación enérgica y manteniendo la temperatura a -5 °C durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 15 minutos adicionales a -5 °C y a continuación se divide en 4 porciones iguales.

5 **Paso 2: Desbromación**

Cada porción de la mezcla junto con tetrahidrofurano (2133,6 gramos) se introduce en un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 22 litros dotado de un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición. En el embudo de adición, se introduce DBU (1,3-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno, 222,9 gramos). Se adiciona el DBU al matraz con agitación enérgica y manteniendo la temperatura a 0 °C-5 °C durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 15 min adicionales a 0 °C-5 °C.

10 **Paso 3: Reacción de acoplamiento**

15 A continuación, se añade 2-hidroxi-1,4-naftofurano (231 gramos) al matraz. Se introduce DBU adicional (246,0 gramos) en el embudo de adición y a continuación se adiciona a la mezcla en el matraz a una velocidad tal que la temperatura de la mezcla de reacción no exceda 40 °C. Despues de completar la adición de DBU, la mezcla resultante se agita durante la noche a temperatura ambiente, y se toma una muestra de la mezcla de reacción para el análisis de HPLC.

20 **Paso 4: Cristalización**

25 Se añade agua (10,8 litros) a la mezcla de reacción y la mezcla resultante se enfria hasta 0 °C-3 °C durante al menos 30 minutos, a continuación se filtra a través de un filtro de vacío. El sólido filtrado se lava sucesivamente con bicarbonato de sodio acuoso al 5 % (3 litros), agua (3 litros), ácido acético acuoso al 1 % (3 litros) y etanol dos veces (2 X 1 litro).

30 El sólido lavado se almacena y se agrupa con los otros lotes. El producto crudo combinado (28,73 kg) se introduce junto con acetato de etilo (811,7 kg) en un recipiente de 500 galones dotado de un agitador mecánico, termómetro y un condensador. En atmósfera de nitrógeno, la mezcla se calienta a reflujo (72 °C) durante 2 horas y a continuación se filtra con un filtro de cartucho de 10 micras que contiene una capa de carbón activo para eliminar los componentes insolubles.

35 Se utiliza acetato de etilo caliente recién preparado (10 kg) para lavar el recipiente, la línea de transferencia y el filtro. El filtrado combinado se enfria hasta 0-5 °C y se mantiene a esta temperatura durante 2 horas, y a continuación se filtra con un filtro Buchner de 20 pulgadas. El producto sólido filtrado se lava con acetato de etilo a 0-5 °C (5,7 kg) y se seca al vacío a 40 °C hasta obtener un peso constante. El filtrado restante se reduce en volumen en un 63 % por evaporación, y el proceso de cristalización se repitió de nuevo para generar un segundo lote de producto que también se secó en las mismas condiciones que el primer lote de producto.

40 Se obtuvo un lote del compuesto de naftofurano siguiendo el procedimiento. La pureza del lote de compuesto es de un 95,44 % de área (HPLC).

EJEMPLO 2: Preparación de un compuesto de naftofurano

45 Otro procedimiento para la preparación de un compuesto de naftofurano (2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona) se resume de la siguiente manera:

50 **Paso 1: Bromación**

55 En un MFR (Matraz de Fondo Redondo) de 12 l (protegido de la luz con filtros de UV), se introdujo MVK (2160 ml, 26,4 mol) y se enfrió hasta -9,6 °C en un baño de acetona/nieve carbónica. Se añadió bromo (1300 ml, 25,3 mol) lentamente, durante 2 horas y 20 min, manteniendo $T = < -2,6$ °C ($T_{máx}$). La mezcla de color amarillo resultante se agitó durante 28 min adicionales.

60 **Paso 2: Deshidrobromación**

65 En un MFR de 72 l con THF (tetrahidrofurano) enfriado previamente (20 l, 5 ml/g de HNQ (2-hidroxi-1,4-naftoquinona)), se introdujo el producto bromado del paso anterior y la solución resultante se enfrió hasta -4,8 °C. Se disolvió DBU (4200 ml, 28,1 mol) en THF (4200 ml) y se añadió lentamente, durante 2 horas y 20 min, manteniendo $T < 0,3$ °C ($T_{máx}$). La suspensión resultante se agitó durante 42 min.

Paso 3: Acoplamiento

70 Se introdujo 2-hidroxi-1,4-naftofurano (4003 g, 23,0 mol), en una porción, en la mezcla de reacción del paso anterior, a -1,8 °C. Se añadió un baño de refrigeración mientras se añadía una segunda porción de DBU (3780 ml, 25,3 mol)

durante 48 minutos para llevar la temperatura de reacción hasta 40 °C. Se retiró el baño de refrigeración y la mezcla de reacción se agitó durante el fin de semana, abierta al aire.

Paso 4: Aislamiento del material crudo

- 5 En un reactor de 200 l con agua enfriada previamente (100 l, 25 ml/g de HNQ), se introdujo la mezcla de reacción del paso anterior. La suspensión resultante se enfrió hasta 6,0 °C, y a continuación se agitó a $T = 3 \pm 3$ °C durante ~ 1 hora. A continuación, la suspensión resultante se filtró y los sólidos recolectados se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l.
- 10 Despues de agitar en NaHCO_3 acuoso al 5 % (26 l, 6,5 ml/g de HNQ) durante 1 hora, la suspensión se filtró. Los sólidos recolectados se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l, se agitaron en agua (26 l) durante 1 hora y a continuación se filtraron.
- 15 Los sólidos húmedos se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l, se agitaron en ácido acético acuoso al 1 % (26 l) durante ~ 1 hora, se filtraron y a continuación se lavaron sobre el embudo de filtración con agua (10 l). Los sólidos recolectados se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l y se calentaron en etanol (17,5 l; 4,3 ml/g de HNQ) a un reflujo suave (77,4 °C). La suspensión resultante se enfrió hasta 4,2 °C y se filtró.
- 20 Los sólidos húmedos se transfirieron a un reactor de 100 l y se calentaron en etanol (17,5 l; 4,3 ml/g de HNQ) a reflujo (77,6 °C). La suspensión resultante se enfrió hasta 4,5 °C y se filtró. La masa húmeda se secó durante la noche. Se tomaron muestras para ^1H RMN y HPLC. ^1H RMN: Compuesto 1 / NDHF (2-acetil-2,3-dihidronafto[2,3-b]furán-4,9-diona) 42:58 %; HPLC: Compuesto 1 / NDHF 74:11 en % de área.
- 25 Los sólidos se secaron en un horno al vacío a 50 °C, durante 4 días, para proporcionar 2268 g de Compuesto 1 crudo. ^1H RMN: Compuesto 1 / NDHF 41:59 %; HPLC: Compuesto 1 / NDHF 67:11 en % de área.

Paso 5: Oxidación del naftodihidrofurano

- 30 El Compuesto 1 crudo (2,268 kg) se suspendió en tolueno (77 l). Se añadió MnO_2 (9536 g) y la mezcla se calentó a un reflujo suave. La TLC (EA:hexano 1:1) mostró una reacción completa después de 1 hora.
- 35 A continuación, la mezcla de reacción se filtró en caliente a través de un lecho calentado previamente de Celite (1530 g, capa inferior), carbón activado (2230 g, capa del medio) y Celite (932 g, capa superior). Se recolectó el filtrado de color amarillo-naranja.
- 40 El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio hasta aproximadamente 1/10 del volumen. La suspensión se filtró y se lavó con tolueno. A continuación, los cristales se secaron a 50 °C para obtener 952 g (42 %) de un sólido de color amarillo oscuro. HPLC: 99,94 %. La ^1H RMN no mostró naftodihidrofurano.
- 45 Los cristales se secaron a 50 °C al vacío durante 46-65 horas adicionales para reducir la cantidad de tolueno residual en el material.

Paso 6: Tratamiento con acetato de etilo

- 50 El Compuesto 1 (5816 g) se introdujo en un recipiente de reacción de 200 l. Se añadió acetato de etilo (145 l, 25 ml/g) y la solución se calentó a reflujo durante 2 horas y 26 minutos. El reflujo se mantuvo durante 5 horas y 30 minutos, y a continuación la mezcla se enfrió y se mantuvo durante la noche a 17 °C.
- 55 La suspensión se filtró en una placa frita de polietileno. Los cristales de color amarillo se secaron al aire, a continuación se colocaron en bandejas en un horno al vacío durante 75 horas, para obtener 5532 g (95,1 % de rendimiento) de los sólidos de color amarillo. HPLC: 99,86 %. La ^1H RMN coincide con la estructura del Compuesto 1.

Paso 7: Recristalización con acetato de etilo

- 60 En un MFR de 2 l, se introdujo material crudo (10 g) y acetato de etilo (900 ml). La mezcla se calentó a reflujo a ~77 °C y a continuación se añadió más acetato de etilo (100 ml) para conseguir una disolución completa. La solución amarillenta transparente resultante se agitó a reflujo durante ~30 minutos y a continuación se retiró la fuente de calentamiento. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente.
- 65 La suspensión resultante se filtró y los sólidos de color amarillo recolectados se lavaron sobre el embudo con acetato de etilo (30 ml). El sólido húmedo se secó en un horno al vacío a 40-50 °C, durante 4 horas, para obtener 8,53 g de producto cristalino de color amarillo (rendimiento total ~17 %).
- 66 ^1H RMN: coherente con la estructura; HPLC: 99,94 % de área; CDB: 228,68 °C, 151 J/g.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el Compuesto 1 utilizado en los siguientes ejemplos se preparó como en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3: Micronización del compuesto de naftofurano

- 5 Por ejemplo, los cristales del Compuesto 1 se molieron y se hicieron pasar a través de un tamiz de 160 micras (μm) (tamiz n.º 100, apertura de 150 μm) para generar cristales de aproximadamente 160 micras o menos.
- 10 Por ejemplo, los cristales del Compuesto 1 se molieron (molino ultra centrífugo Retsch ZM 200; de paso único, a 18 000 rpm utilizando una pantalla de 0,25 mm) hasta obtener una mediana de tamaño de partícula de aproximadamente 20 micras. La Tabla 3 presenta la distribución resultante de los tamaños de partícula (Malvern 2000 con el accesorio para vía húmeda Hydro 2000S). Las columnas presentan el tamaño máximo de las partículas en el porcentaje total acumulado presentado en el subíndice en el encabezado de la columna. Por ejemplo, la columna D_{90} presenta el tamaño para el cual un 90 % de las partículas tienen un tamaño igual o menor. La columna D_{50} representa la mediana del tamaño - la mitad de las partículas tienen un tamaño mayor y la mitad de las partículas tienen un tamaño igual o menor.
- 15

Tabla 3. Distribución de tamaño de partícula del Compuesto 1 molido.

	Tamaño de partícula (micras)		
	D_{90}	D_{50}	D_{10}
Muestra B	48,9	20,2	2,3

- 20 Por ejemplo, los cristales del Compuesto 1 se micronizaron utilizando un método de molienda con un molino de chorro (molino de chorro de 4", presión de Venturi = 40, presión del molino = 100, velocidad de alimentación = 1304 g/hora) hasta obtener una mediana de tamaño de partícula de aproximadamente 2 micras, como se presenta en la Tabla 4. El análisis del tamaño de partícula se realizó utilizando un método de partículas en seco (analizador de tamaño de partícula KF/Sympatec Helos).
- 25

Tabla 4. Distribución de tamaño de partícula del Compuesto 1 micronizado

	Tamaño de partícula (micras)		
	D_{90}	D_{50}	D_{10}
Muestra A	4,63	2,07	0,53

- 30 Una función de distribución acumulada derivada de un modelo logarítmico normal de distribución de tamaño de partícula proporcionó un buen ajuste para los datos presentados en la Tabla 4. La función de distribución acumulada se representó como

$$\text{CDF}(d) = \frac{1}{2} \left(1 + \text{erf} \left(\frac{\ln(d) - \ln(d_{\text{mediana}})}{\sigma \sqrt{2}} \right) \right),$$

- 35 donde erf es la función de error, d es la variable de diámetro de partícula, d_{mediana} es la mediana del tamaño de partícula y σ es un parámetro relacionado con la amplitud de la función de distribución acumulada. CDF(d) representa la fracción de partículas que tienen un tamaño inferior o igual a d . Fijando la d_{mediana} como la mediana observada de 2,07 micras, el ajuste del modelo proporcionó un valor de $\sigma = 1,06$. El modelo indicó un diámetro medio de 3,6 micras y un modo del diámetro de 0,67 micras. El modelo también sugiere un área específica de las partículas de 2200 m^2/kg , aunque esto no tiene en cuenta factores como la rugosidad superficial.
- 40

EJEMPLO 4: Farmacocinética en ratones de formulaciones con una mediana del tamaño de partícula de 2 micras, 20 micras y 150 micras

- 45 En un experimento, el Compuesto 1 micronizado preparado en el paso 6 del Ejemplo 2 con un tamaño de partícula medio de 2 micras, 20 micras y 150 micras se formuló como suspensiones en Gelucire 44/14 al 20 % y Tween 80 al 1 % y se administró por vía oral a ratones con una dosis de 100 mg/kg. Cada punto de tiempo representa el promedio de 3 ratones (Figura 16).

- 50 Como se muestra en la Figura 16, aunque el Compuesto 1 con un tamaño de partícula de entre 125-150 micras muestra un nivel de exposición menor en comparación con las partículas de 2 micras y 20 micras cuando se suministra en todos los casos con una dosis de 100 mg/kg, muestra el mismo patrón. Los tamaños de partículas del Compuesto

1 de 20 micras (d50) muestran una exposición en plasma similar a los del Compuesto 1 con un tamaño de partícula de 2 micras (d50). Además, si se duplica la exposición del Compuesto 1 de 125-150 micras, sería muy similar a la gráfica PK de 2 y 20 micras.

5 **EJEMPLO 5: Las formulaciones que tienen un tamaño de partícula reducido exhiben una mayor inhibición del crecimiento tumoral**

10 En los presentes estudios, el Compuesto 1 muestra una eficacia débil o nula si se administra a ratones en una composición con un tamaño de partícula superior a 20 micras. Sin embargo, se observó que el Compuesto 1 tiene una actividad antitumoral potente sin toxicidad observada si el compuesto se administra en una composición con un tamaño de partícula inferior a 5 micras.

15 En un experimento, se evaluó una formulación de partículas del Compuesto 1 tamizadas a 160 micras en un modelo de ratones immunodeprimidos con xenoinjerto subcutáneo establecido de cáncer de cabeza y cuello humano FaDu. La composición farmacéutica se formuló como 80 mg/ml en Gelucire al 9 % y Vitamina E TPGS al 20 % (Tabla 3). No se observó eficacia con la dosis de 400 mg/kg de dosificación oral diaria (también se administró un control de vehículo), como se muestra en la Figura 15. Este nivel de dosis es 4 veces más alto que el utilizado en el experimento de PK que se muestra en la Figura 16. Por lo tanto, estos ratones reciben una exposición 4 veces mayor que la observada al dosificar 100 mg/kg del Compuesto 1 de 2 micras, que muestra una buena eficacia. Todos los regímenes se administraron a diario (qd).

20 En un experimento, los cristales del Compuesto 1 se molieron hasta obtener una mediana de tamaño de partícula de aproximadamente 20 micras. Se observó una eficacia tan solo débil o moderada cuando el Compuesto 1 que se había molido hasta obtener una mediana de tamaño de partícula de aproximadamente 20 micras se suministró por vía oral a diario con una dosis de 200 mg/kg a ratones con xenoinjertos de tumores de cabeza y cuello humanos FaDu (Figura 15) (también se administró un control de vehículo). Todos los regímenes se administraron a diario (qd).

25 También se evaluaron los cristales del Compuesto 1 preparados en el Ejemplo 1. Los cristales del Compuesto 1 se micronizaron utilizando un método de molienda con un molino de chorro (molino de chorro de 4", presión de Venturi = 40, presión del molino = 100, velocidad de alimentación = 1304 g/hora) hasta obtener una mediana de tamaño de partícula de aproximadamente 2 micras, como se presenta en la Tabla 4.

30 Se inocularon células de cáncer de cabeza y cuello humano FaDu por vía subcutánea en ratones atípicos lampiños hembra (6×10^6 células/ratón) y se permitió que se formaran tumores palpables. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 , los animales se trataron por vía oral (po) con el Compuesto 1 con una dosis de 100 mg/kg o control de vehículo a diario. El Compuesto 1 se formuló con una concentración de 10 mg/ml en gelucire al 20 %. Se midieron los tumores y los pesos corporales durante todo el tratamiento (Figuras 15).

35 40 El Compuesto 1 también se micronizó utilizando un método de molienda con un molino de chorro (molino de chorro de orientación horizontal de 8", presión de Venturi = 40, presión del molino = 40, velocidad de alimentación = 1920 g/hora) hasta obtener una mediana de tamaño de partícula de aproximadamente 2 micras, como se presenta en la Tabla 5. El análisis del tamaño de partícula se realizó utilizando un método de partículas en seco (analizador de tamaño de partícula KF/Sympatec Helos). Se observó una actividad antitumoral similar a la del material de 2 micras en la Tabla 4.

45 **Tabla 5. Distribución de tamaño de partícula del Compuesto 1 micronizado**

	Tamaño de partícula (micras)		
	D ₉₀	D ₅₀	D ₁₀
Muestra A	5,5	2,21	0,51

50 Por lo tanto, el Compuesto 1 de 150 micras o 20 micras muestra un patrón de exposición en plasma similar al del Compuesto 1 de 2 micras (Figura 16). Muestran una eficacia diferente: El Compuesto 1 de 150 micras no muestra eficacia (Figura 15); el Compuesto 1 de 20 micras muestra una eficacia débil o moderada; y el Compuesto 1 de 2 micras muestra una eficacia potente.

55 Como se muestra en la Figura 16, los tamaños de partícula del Compuesto 1 de 20 micras (d50) muestran una exposición en plasma similar en ratones a los del Compuesto 1 con un tamaño de partícula de 2 micras (d50). Sorprendentemente, sin embargo, el Compuesto 1 con un tamaño de partícula de 20 micras muestra una eficacia solo débil o moderada en modelos de xenoinjerto de ratón, mientras que el Compuesto 1 con un tamaño de partícula de 2 micras muestra una eficacia potente. Este es un resultado inesperado, ya que la interpretación común es que la eficacia de un fármaco se base en su farmacocinética. Por lo tanto, dado que ambos tamaños de partícula muestran la misma farmacocinética, ambos deberían de ser igualmente eficaces.

Además, si se duplica la exposición del Compuesto 1 de 125-150 micras, sería muy similar a la gráfica PK de 2 y 20 micras. Curiosamente, cuando el Compuesto 1 de 150 micras se suministra a ratones con un nivel de incluso 400 mg/kg, tampoco muestra eficacia en modelos de xenoinjerto (Figura 15).

5 Estos resultados van en contra de la visión convencional de que la reducción del tamaño de partícula conduce a una mayor exposición en plasma y, por lo tanto, una mejor eficacia.

EJEMPLO 6: Ensayo de HPLC

10 Este método de HPLC es para evaluar la pureza de un naftofuran, p. ej., 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona (Compuesto 1) y la finalización de su reacción por HPLC. Todos los componentes se expresarán en porcentaje de área de los picos totales dentro del cromatograma.

1. APARATOS Y MATERIALES (Tabla 6A)

Aparato	Sistema de HPLC con detector de UV y sistema de integración
Columna	Phenomenex Luna C18(2) 5 µm, 4,6 mm × 250 mm (PIN 00G-4252-E0) o equivalente
Peachímetro	Calibrado el día de su uso
Acetonitrilo	Grado HPLC
Sulfóxido de dimetilo (DMSO)	Grado ACS o superior
Ácido fosfórico	Reactivos ACS
Fosfato de potasio, dibásico	Reactivos ACS
Compuesto 1	Material de referencia

2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Tampón de fosfato 10 mM

20 Se pesan 1,74 g de fosfato de potasio, dibásico y se diluyen con 1 l de agua purificada (se ajustan los pesos y volúmenes según la cantidad necesaria). Se ajusta el pH con ácido fosfórico hasta un pH de 6,8.

Fase móvil A

25 La fase móvil A se prepara mezclando el tampón de fosfato 10 mM y acetonitrilo hasta obtener una relación de tampón:acetonitrilo 80:20. Se desgasifica.

Fase móvil B

30 La fase móvil B se prepara mezclando el tampón de fosfato 10 mM y acetonitrilo hasta obtener una relación de tampón:acetonitrilo 20:80. Se desgasifica.

Diluyente

35 La fase móvil A se utilizará como diluyente para todas las preparaciones de muestras y patrones.

3. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES

Patrón madre del Compuesto 1 (concentración ≈ 1,0 mg/ml)

40 Se preparará pesando 10 mg de material de referencia del Compuesto 1 en un vial de centelleo de 20 ml; se registra el peso \pm 0,01 mg. Se añaden 10 ml de DMSO y se someten a sonicación hasta que se disuelven los sólidos.

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{Peso de patrón de referencia, mg}) \times \text{Pureza decimal del patrón}}{(\text{Volumen de solución madre, ml})}$$

Muestras de prueba madre (concentración ≈ 1,0 mg/ml)

45 Las soluciones de prueba se prepararán pesando 10 mg de muestra en un vial de centelleo de 20 ml y diluyéndolas con 10 ml de DMSO.

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{Peso de la muestra, mg})}{(\text{Volumen de solución madre, ml})}$$

Muestras de prueba de trabajo (concentración $\approx 0,01$ mg/ml)

5 Esta solución se prepara transfiriendo 1 ml a un matraz aforado de 100 ml y diluyendo con solución diluyente.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Concentración de la muestra de prueba madre} \times (\text{volumen transferido, ml})}{(\text{Volumen de solución de trabajo, ml})}$$

4. CONDICIONES OPERATIVAS DEL INSTRUMENTO (Tabla 6B)

10

Caudal	0,8 ml/min
Temp. de la columna	30 °C
Longitud de onda del detector	270 nm
Volumen de inyección	40 µl
Perfil de gradiente	0-5 min - de un 0 % de B a un 0 % de B 5-19 min - de un 0 % de B a un 90 % de B 19-24 min - de un 90 % de B a un 90 % de B 24-29 min - de un 90 % de B a un 0 % de B Nota: tiempo de equilibración de 5 min entre inyecciones con un 100 % de A
Tiempo de ejecución	29 min

5. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Las soluciones se inyectan con la siguiente secuencia:

15

1. Blanco de diluyente (1X)
2. Patrón de trabajo del Compuesto 1 (5X)
- 20 3. Soluciones de prueba (2X cada una)
4. Patrones de trabajo (1X cada uno)

6. IDONEIDAD DEL SISTEMA

25

El sistema es adecuado para su uso si se cumplen los siguientes criterios.

30

1. La inyección del blanco de diluyente al principio de la secuencia no contiene picos que interfieran con ninguna de las impurezas identificadas.
2. Las 5 inyecciones iniciales replicadas del patrón de trabajo del Compuesto 1 tienen (1) % de RSD_{área del pico} < 3,0 %; (2) % de RSD_{tiempo de retención} < 3,0 %; y (3) factor de simetría medio < 2,0.
3. En el cromatograma para el patrón entre paréntesis, (1) el tiempo de retención es un 97,0 - 103,0 % del tiempo de retención medio de las inyecciones iniciales de idoneidad y (2) su % de área es un 97,0-103,0 % del valor inicial.

7. CÁLCULOS

40

Todos los picos se indicarán como un % de área de los picos totales en el cromatograma, esto será calculado por el software de integración con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de área} = \frac{\text{Recuento de área del pico}}{\text{Área total de todos los picos}} \times 100$$

RMN y TLC

5 RMN (Tabla 6C)

Aparato	Espectrómetro de RMN Varian Inova 500
Secuencia de pulso	S2pul
Disolvente	CDC13
Temp.	25,0 °C / 298,1 K
Retraso de relajación	1,000 s
Pulso	45,0 grados
Tiempo de adq.	2,732 s
Anchura	11992,2 Hz
	32 repeticiones
OBSERVACIÓN DE H1	499,7029706 MHz
Tamaño de FT	65536
Tiempo total	1 min, 50 s

TLC en gel de sílice (Tabla 6D)

eluyente	acetato de etilo : hexano, 1 : 1
visualización	UV
Rf401	~0,7
RfNDHF	~0,6

10

EJEMPLO 7: Preparación de 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona

A continuación, se proporciona un procedimiento para la preparación del Compuesto 1.

15

Paso 1: Bromación

20

En un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 2 litros dotado de un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición, se introduce 3-buten-2-ona (451,2 gramos). Se añade bromo (936,0 gramos) al embudo de adición. Después de que el contenido del matraz se haya enfriado hasta -5 °C, se adiciona el bromo al matraz con agitación energética y manteniendo la temperatura a -5 °C durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 15 minutos adicionales a -5 °C y a continuación se divide en 4 porciones iguales.

30

Paso 2: Desbromación

25

Cada porción de la mezcla junto con tetrahidrofuran (2133,6 gramos) se introduce en un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 22 litros dotado de un agitador mecánico, termómetro y embudo de adición. En el embudo de adición, se introduce DBU (1,3-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno, 222,9 gramos). Se adiciona el DBU al matraz con agitación energética y manteniendo la temperatura a 0 °C-5 °C durante 30 minutos. La mezcla se agita durante 15 min adicionales a 0 °C-5 °C.

Paso 3: Reacción de acoplamiento

35

A continuación, se añade 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (231 gramos) al matraz. Se introduce DBU adicional (246,0 gramos) en el embudo de adición y a continuación se adiciona a la mezcla en el matraz a una velocidad tal que la temperatura de la mezcla de reacción no exceda 40 °C. Después de completar la adición de DBU, la mezcla resultante se agita durante la noche a temperatura ambiente, y se toma una muestra de la mezcla de reacción para el análisis de HPLC.

5 Se añade agua (10,8 litros) a la mezcla de reacción y la mezcla resultante se enfría hasta 0 °C-3 °C durante al menos 30 minutos, a continuación se filtra a través de un filtro de vacío. El sólido filtrado se lava sucesivamente con bicarbonato de sodio acuoso al 5 % (3 litros), agua (3 litros), ácido acético acuoso al 1 % (3 litros) y etanol dos veces (2 X 1 litro).

Paso 4: Cristalización

- 10 El sólido lavado se almacena y se agrupa con los otros lotes. El producto crudo combinado (28,73 kg) se introduce junto con acetato de etilo (811,7 kg) en un recipiente de 500 galones dotado de un agitador mecánico, termómetro y un condensador. En atmósfera de nitrógeno, la mezcla se calienta a reflujo (72 °C) durante 2 horas y a continuación se filtra con un filtro de cartucho de 10 micras que contiene una capa de carbón activo para eliminar los componentes insolubles.
- 15 Se utiliza acetato de etilo caliente recién preparado (10 kg) para lavar el recipiente, la línea de transferencia y el filtro. El filtrado combinado se enfría hasta 0-5 °C y se mantiene a esta temperatura durante 2 horas, y a continuación se filtra con un filtro Buchner de 20 pulgadas. El producto sólido filtrado se lava con acetato de etilo a 0-5 °C (5,7 kg) y se seca al vacío a 40 °C hasta obtener un peso constante.
- 20 El filtrado restante se reduce en volumen en un 63 % por evaporación, y el proceso de cristalización se repitió de nuevo para generar un segundo lote de producto que también se secó en las mismas condiciones que el primer lote de producto.
- 25 Se obtuvieron dos lotes de Compuesto 1 tras el procedimiento. Un lote tiene una pureza de un 91,64 % de área y el otro lote tiene una pureza de un 95,44 % de área, medida por HPLC.

EJEMPLO 8: Preparación de 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona cruda

30 Otro procedimiento para la preparación del Compuesto 1 se resume de la siguiente manera.

Paso 1: Bromación

35 En un MFR (Matraz de Fondo Redondo) de 12 l (protegido de la luz con filtros de UV), se introdujo MVK (2160 ml, 26,4 mol) y se enfrió hasta -9,6 °C en un baño de acetona/nieve carbónica. Se añadió bromo (1300 ml, 25,3 mol) lentamente, durante 2 horas y 20 min, manteniendo $T = < -2,6$ °C ($T_{\text{máx}}$). La mezcla de color amarillo resultante se agitó durante 28 min adicionales.

Paso 2: Deshidrobromación

40 En un MFR de 72 l con THF (tetrahidrofuran) enfriado previamente (20 l, 5 ml/g de HNQ (2-hidroxi-1,4-naftoquinona)), se introdujo el producto bromado del paso anterior y la solución resultante se enfrió hasta -4,8 °C. Se disolvió DBU (4200 ml, 28,1 mol) en THF (4200 ml) y se añadió lentamente, durante 2 horas y 20 min, manteniendo $T < 0,3$ °C ($T_{\text{máx}}$). La suspensión resultante se agitó durante 42 min.

45 **Paso 3: Acoplamiento**

50 Se introdujo 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (4003 g, 23,0 mol), en una porción, en la mezcla de reacción del paso anterior, a -1,8 °C. Se añadió un baño de refrigeración mientras se añadía una segunda porción de DBU (3780 ml, 25,3 mol) durante 48 minutos para llevar la temperatura de reacción hasta 40 °C. Se retiró el baño de refrigeración y la mezcla de reacción se agitó durante el fin de semana, abierta al aire.

Paso 4: Aislamiento del material crudo

55 En un reactor de 200 l con agua enfriada previamente (100 l, 25 ml/g de HNQ), se introdujo la mezcla de reacción del paso anterior. La suspensión resultante se enfrió hasta 6,0 °C, y a continuación se agitó a $T = 3 \pm 3$ °C durante ~1 hora. A continuación, la suspensión resultante se filtró y los sólidos recolectados se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l.

60 Después de agitar en NaHCO₃ acuoso al 5 % (26 l, 6,5 ml/g de HNQ) durante 1 hora, la suspensión se filtró. Los sólidos recolectados se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l, se agitaron en agua (26 l) durante 1 hora y a continuación se filtraron.

65 Los sólidos húmedos se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l, se agitaron en ácido acético acuoso al 1 % (26 l) durante ~1 hora, se filtraron y a continuación se lavaron sobre el embudo de filtración con agua (10 l). Los sólidos recolectados se transfirieron de nuevo al reactor de 200 l y se calentaron en etanol (17,5 l; 4,3 ml/g de HNQ) a un reflujo suave (77,4 °C). La suspensión resultante se enfrió hasta 42 °C y se filtró.

5 Los sólidos húmedos se transfirieron a un reactor de 100 l y se calentaron en etanol (17,5 l; 4,3 ml/g de HNQ) a reflujo (77,6 °C). La suspensión resultante se enfrió hasta 4,5 °C y se filtró. La masa húmeda se secó durante la noche. Se tomaron muestras para ¹H RMN y HPLC. ¹H RMN: Compuesto 1 / NDHF (2-acetil-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona) 42:58 %; HPLC: Compuesto 1 / NDHF 74:11 en % de área.

Los sólidos se secaron en un horno al vacío a 50 °C, durante 4 días, para proporcionar 2268 g de Compuesto 1 crudo. ¹H RMN: Compuesto 1 / NDHF 41:59 %; HPLC: Compuesto 1 / NDHF 67:11 en % de área.

10 **EJEMPLO 9: Oxidación del naftodihidrofurano**

El Compuesto 1 crudo (2,268 kg) se suspendió en tolueno (77 l). Se añadió MnO₂ (9536 g) y la mezcla se calentó a un reflujo suave. La TLC (EA:hexano 1:1) mostró una reacción completa después de 1 hora.

15 A continuación, la mezcla de reacción se filtró en caliente a través de un lecho calentado previamente de Celite (1530 g, capa inferior), carbón activado (2230 g, capa del medio) y Celite (932 g, capa superior). Se recolectó el filtrado de color amarillo-naranja.

20 El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio hasta aproximadamente 1/10 del volumen. La suspensión se filtró y se lavó con tolueno. A continuación, los cristales se secaron a 50 °C para obtener 952 g (42 %) de un sólido de color amarillo oscuro. HPLC: 99,94 %. La ¹H RMN no mostró naftodihidrofurano.

25 Los cristales se secaron a 50 °C al vacío durante 46-65 horas adicionales para reducir la cantidad de tolueno residual en el material.

25 **EJEMPLO 10: Tratamiento con acetato de etilo**

El Compuesto 1 (5816 g) se introdujo en un recipiente de reacción de 200 l. Se añadió acetato de etilo (145 l, 25 ml/g) y la solución se calentó a reflujo durante 2 horas y 26 minutos. El reflujo se mantuvo durante 5 horas y 30 minutos, y a continuación la mezcla se enfrió y se mantuvo durante la noche a 17 °C.

30 La suspensión se filtró en una placa frita de polietileno. Los cristales de color amarillo se secaron al aire, a continuación se colocaron en bandejas en un horno al vacío durante 75 horas, para obtener 5532 g (95,1 % de rendimiento) de los sólidos de color amarillo. HPLC: 99,86 %. La ¹H RMN coincide con la estructura del Compuesto 1.

35 **EJEMPLO 11: Recristalización con acetato de etilo**

En un MFR de 2 l, se introdujo material crudo (10 g) y acetato de etilo (900 ml). La mezcla se calentó a reflujo a ~77 °C y a continuación se añadió más acetato de etilo (100 ml) para conseguir una disolución completa. La solución amarillenta transparente resultante se agitó a reflujo durante ~30 minutos y a continuación se retiró la fuente de calentamiento. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

40 La suspensión resultante se filtró y los sólidos de color amarillo recolectados se lavaron sobre el embudo con acetato de etilo (30 ml). El sólido húmedo se secó en un horno al vacío a 40-50 °C, durante 4 horas, para obtener 8,53 g de producto cristalino de color amarillo (rendimiento total ~17 %).

45 ¹H RMN: coherente con la estructura; HPLC: 99,94 % de área; CDB: 228,68 °C, 151 J/g.

50 **EJEMPLO 12: Identificación de compuestos de naftofurano que actúan sobre el cáncer y las células madre cancerosas**

Métodos

55 **En las evaluaciones *in vivo*:** También se realizaron examinaciones diarias del estado de salud de cada animal. Los pesos corporales se comprobaron cada tres días. Se suministraron alimentos y agua a diario de acuerdo con los procedimientos de cría de animales de las instalaciones. Se consideró que un tratamiento que producía una letalidad > 20 % y una pérdida neta de peso corporal > 20 % era tóxico. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (mm³) ± EE. Se considera que unos valores de P < 0,05 son estadísticamente relevantes.

60 **Cría de animales:** Los ratones atípicos lampíos macho o hembra de 4-5 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA.) se aclimataron a las instalaciones de alojamiento de animales durante al menos 1 semana antes del inicio del estudio. Todos los procedimientos experimentales utilizados cumplieron con las directrices marcadas por la Sociedad Americana de Fisiología y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y también fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Boston Biomedical Inc. Los animales se alojaron en grupos de cuatro en jaulas con virutas de madera en una habitación con condiciones controladas de

temperatura (68 °F-72 °F), luz (ciclo de 12 h de luz-oscuridad) y humedad (45-55 %). Durante el experimento, los animales tuvieron libre acceso a agua y alimentos.

EJEMPLO 13: Ensayo clínico: Seguridad y eficacia

5 Se seleccionó 2-acetilnafto[2,3-b]furan-4,9-diona para entrar en un ensayo clínico de Fase I después de recibir la aprobación del IND de la FDA de los EE. UU. y Health Canada, que era un estudio de aumento de la dosis en pacientes adultos con cáncer avanzado en los que habían fracasado las terapias estándar. Un ciclo consiste en la administración oral dos veces al día del compuesto durante 4 semanas. Los ciclos se repitieron cada 4 semanas (28 días) hasta que 10 se produjo una progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable u otro criterio de interrupción. El ensayo de aumento de la dosis se llevó a cabo como un ensayo abierto y de múltiples centros. Se utilizó un esquema modificado de titulación acelerada de Simon para el aumento de la dosis.

15 El objetivo principal del ensayo era determinar la seguridad, la tolerabilidad y la dosis recomendada de la fase II (DRF2). Los objetivos secundarios del ensayo eran determinar el perfil farmacocinético del compuesto, la farmacodinámica del compuesto y la actividad antitumoral preliminar del compuesto.

20 Los criterios de inclusión incluyeron un tumor sólido confirmado histológica o citológicamente que fuera metástásico, no extirpable o recidivante; ≥ 18 años de edad; enfermedad medible por RECIST; y Karnofsky ≥ 70 %. Los criterios de exclusión incluyeron quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia o agente de investigación dentro de un período de 4 semanas desde la primera dosis; cirugía dentro de un período de 4 semanas desde la primera dosis; y metástasis cerebrales conocidas.

25 A fecha de 7 de febrero de 2011, 42 pacientes de cáncer con varios tumores sólidos avanzados en los que habían fracasado las quimioterapias fueron inscritos en el estudio. Los datos demográficos y las características basales de la enfermedad de los pacientes seleccionados según los criterios anteriores se han resumido en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos demográficos y características basales de la enfermedad

Pacientes (N = 42)		
Edad (años)	Media	59,6 (12.7)
	Mín, Máx	28 , 91
Sexo [N (%)]	Hombres	29 (70,7 %)
	Mujeres	12 (29,3 %)
Raza [N (%)]	Caucasoide	33 (80,5 %)
	Asiática	3 (7,3 %)
	De color	1 (2,4 %)
	Otra	2 (4,9 %)
	Hispano	0 (0 %)
Terapias anteriores¹	> 3	20
	2	2
	1	4

30 De estos 42 pacientes, se evaluaron 10 cohortes con dosis comprendidas en el intervalo de 20 mg a 2000 mg/día. El aumento de la dosis fue bien tolerado y no se observó toxicidad limitante de la dosis. Los eventos adversos fueron generalmente leves, siendo los más comunes: diarrea, náuseas y fatiga. Los eventos de grado 3 o superior incluyen: fatiga y diarrea. Estos eventos adversos son registros de lo que estos pacientes con cáncer de estado avanzado experimentan durante el ensayo clínico, que pueden o no estar relacionados con el Compuesto 1. Los eventos adversos se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de eventos adversos

Término del evento	Cualquier grado		Grado 1		Grado 2		Grado 3	
	n.º de eventos	% del total	n.º de eventos	% del total	n.º de eventos	% del total	n.º de eventos	% del total
Dolor	23	28,4 %	20	24,7 %	2	2,5 %	1	1,2 %
Vomitos	14	17,3 %	13	16,0 %	1	1,2 %	0	0,0 %
Nauseas	10	12,3 %	8	9,9 %	2	2,5 %	0	0,0 %
Dolores abdominales	8	7,4 %	8	6,3 %	1	1,2 %	0	0,0 %
Deshidratación	5	6,2 %	2	2,5 %	3	3,7 %	0	0,0 %
Fatigue	4	4,8 %	1	1,2 %	2	2,5 %	1	1,2 %
Anorexia	4	4,8 %	3	3,7 %	1	1,2 %	0	0,0 %
Dysgeusia	3	3,7 %	3	3,7 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Reducción del apetito	2	2,5 %	1	1,2 %	1	1,2 %	0	0,0 %
Fiebre	2	2,5 %	1	1,2 %	1	1,2 %	0	0,0 %
Sarpullido en la piel	2	2,5 %	2	2,5 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Vertigo	2	2,5 %	2	2,5 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Heces blandas	2	2,5 %	2	2,5 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Camino de color de la orina	2	2,5 %	2	2,5 %	0	0,0 %	0	0,0 %

Hasta la fecha, no se ha alcanzado la DMT ni la DRF2. Las dosis de aproximadamente 1000 mg/día del compuesto exhibieron una farmacocinética favorable con una farmacocinética lineal aparente y sin evidencia de acumulación del fármaco después de la administración diaria repetida cada 28 días. Al nivel de dosis de 320 mg/día, la concentración en plasma del compuesto se mantuvo durante más de 8 horas a una concentración de al menos 1,5 μ M (CI₅₀ del compuesto *in vitro*: 30-500 nM). Las concentraciones en plasma medias de los diferentes grupos de dosis se muestran en la Figura 12.

5

10 De los 42 pacientes que recibieron la dosis, 24 fueron evaluables para la respuesta tumoral a fecha de 7 de febrero de 2011; 16 (16/24 pacientes evaluables) consiguieron una enfermedad estable (de 8 a más de 75 semanas). Los pacientes inscritos hasta la fecha se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Pacientes inscritos hasta la fecha

Paciente	Dosis diaria total (mg)	Pauta	Diagnóstico	Mejor respuesta (RECIST 1.1)	Lesiones nuevas
0001	20	qd	Adenocarcinoma de colon	MR (37,5 % de remisión)	1
0002	40	qd	Adenocarcinoma gástrico	PD	3
0003	80	qd	Carcinoma de cabeza y cuello	SD	0
0004	80	bid	Adenocarcinoma de colon	PD	0
0005	160	bid	Melanoma	n.e.	n.e.
0006	160	bid	Adenocarcinoma de pulmón	SD	0
0007	320	bid	Adenocarcinoma de pulmón	n.e.	n.e.
0008	320	bid	Adenocarcinoma de colon	SD	2
0009	320	bid	Carcinoma de cabeza y cuello	n.e.	n.e.
0010	320	bid	Adenocarcinoma de colon	SD	0
0011	320	bid	Angiosarcoma	SD	0
0012	320	bid	Cáncer de próstata	PD	0
0013	400	bid	Adenocarcinoma gástrico	SD (Signos de remisión)	0
0014	400	bid	Cáncer de ovario	SD (CA 125 normalización)	0
0015	400	bid	Adenocarcinoma de colon	SD (CEA % >30-60%)	0

Paciente	Dosis diaria total (mg)	Pauta	Diagnóstico	Mejor respuesta (RECIST 1.1)	Lesiones nuevas
0016	600	bid	Adenocarcinoma pancreático	PD	0
0017	600	bid	Cáncer rectal	n.e.	n.e.
0018	600	bid	Cáncer de próstata	n.e.	n.e.
0019	600	bid	Cáncer de pulmón no microcítico	n.e.	n.e.
0020	600	bid	Cáncer de mama	SD (Tumor hueco)	0
0021	800	bid	Condrosarcoma	SD	0
0022	800	bid	Cáncer de próstata	PD	0
0023	800	bid	Adenocorticoide	SD	0
0024	1000	bid	Cáncer rectal	SD	0
0025	1000	bid	Sarcoma	PD	-
0026	1000	bid	Adenocarcinoma pancreático	n.e.	n.e.
0027	1400	bid	Adenocarcinoma de colon	PD	2
0028	1400	bid	Adenocarcinoma de colon	PD	-
0029	1400	bid	Melanoma	SD	-

Paciente	Dosis diaria total (mg)	Pauta	Diagnóstico	Mejor respuesta (RECIST 1.1)	Lesiones nuevas
0030	1000	bid	Adenocarcinoma de colon	n.e.	n.e.
0031	1000	bid	Adenocarcinoma de colon	n.e.	n.e.
0032	200	tid	Adenocarcinoma de colon	SD	0
0033	500	tid	Adenocarcinoma de colon	n.e.	n.e.
0034	500	tid	Adenocarcinoma de vejiga	n.e.	n.e.
0035	500	tid	Cáncer colorectal	n.e.	n.e.
0036	500	tid	Cáncer rectal	n.e.	n.e.
0037	500	tid	Adenocarcinoma de colon	SD	0
0038	500	tid	Cáncer pancreático	n.e.	n.e.
0039	200	tid	Cáncer gastroesofágico	-	-
0040	500	bid	Cáncer colorrectal	-	-
0041	500	bid	Cáncer colorrectal	-	-
0042	500	bid	Adenocarcinoma de colon	-	-

16/24 pacientes evaluables mostraron SD/ MR con 12 que mostró una SD prolongada (>12 semanas) según RECIST 1,1; se evitaron nuevas lesiones metastásicas en un 83 % de los pacientes que recibieron dosis.

5 En la Figura 19, se muestra la remisión completa de una lesión metastásica de cáncer de colon al riñón en el paciente 0001. En la administración diaria de 20 mg, se observó una concentración elevada del compuesto en la orina del paciente. El enriquecimiento del compuesto en la orina (Tabla 10) explica la remisión completa observada con una dosificación relativamente baja.

10 En la Figura 19, se muestra la remisión completa de una lesión metastásica de cáncer de colon al riñón en el paciente 0001. En la administración diaria de 20 mg, se observó una concentración elevada del compuesto en la orina del paciente. El enriquecimiento del compuesto en la orina podría ayudar a explicar la remisión completa observada con una dosificación relativamente baja.

15 **Tabla 10. El Compuesto 1 está presente con una concentración elevada en la orina del paciente**

Paciente	Dosis diaria total (mg)	Tiempo después de la dosis (min)	BBI608 (uM)
7	320	120-240	4,3
		360-480	23,1
8	320	120-240	7,9
		360-480	1,8
9	320	120-240	8,9
		360-480	23,6
10	320	120-240	22,7
		360-480	26,2
11	320	120-240	1,8
		360-480	4,5
12	400	120-240	4,11
		360-480	3,86

Paciente	Dosis diaria total (mg)	Tiempo después de la dosis (min)	BBI608 (uM)
14	400	120-240	1,42
		360-480	5
15	600	120-240	3,1
		360-480	10,65
17	600	120-240	1,66
		360-480	45,35
18	600	120-240	2,41
		360-480	6,3
20	800	120-240	6,17
		360-480	118,25
21	800	120-240	0,42
		360-480	7,42
23	800	120-240	2,51
		360-480	11,97

En consecuencia, el compuesto mostró un excelente perfil de seguridad. Hasta la fecha no se ha observado toxicidad limitante de la dosis.

- 5 Además, se ha observado un perfil PK favorable con una dosificación oral bid. La concentración en plasma alcanzó varios múltiplos de la concentración eficaz (Cl_{50} *in vitro*). En la Tabla 11 se muestran los datos de AUC.

Tabla 11. Resumen de AUC para diferentes niveles de dosis

Dosis diaria total (mg) de una dosificación BID	AUC ₀₋₂₄ (uM·h)	SD
80	7,95	
160	9,52	0,91
320	29,79	14,95
400	53,61	19,55
600	27,27	5,97
800	26,43	5,27
1000	42,61	8,94
1400	28,38	3,95
2000	39,09	18,66

- 10 Además, se observaron signos de actividad antitumoral. 16 de 24 pacientes mostraron SD/MR según RECIST en una gama de tumores refractarios a quimioterapias, que incluyeron adenocarcinoma colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de ovario y melanoma. Hubo una remisión completa de una lesión metastásica de cáncer de colon en el riñón (Figura 19). Los pacientes tratados con el Compuesto 1 exhibieron una dramática falta de nuevas lesiones tumorales metastásicas. De los 24 pacientes evaluables con cánceres refractarios avanzados, más de un 80 % no mostraron tumores metastásicos.

Se observó que los pacientes que consiguieron prolongar la enfermedad estable (> 16 semanas) durante el tratamiento con BBI608 tenían unos niveles elevados de p-STAT3 en sus tejidos tumorales antes del tratamiento según una inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-p-STAT3 (Figura 25).

EJEMPLO 14: Pautas posológicas

- 20 Según se describe en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que incluye partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención puede ser una dosis diaria total en el intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 2000 mg, de aproximadamente 240 mg a aproximadamente 25

1500 mg. De acuerdo con la presente invención, la dosis diaria total está en el intervalo de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 1000 mg, o de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1000 mg.

- 5 Las pautas posológicas adecuadas incluyen la administración de partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención en una sola dosis diaria. Por ejemplo, en ciertos ejemplos y ejemplos de referencia descritos en el presente documento, las partículas, polimorfos y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en una sola dosis diaria en un intervalo de aproximadamente 20 mg QD a aproximadamente 1000 mg QD.
- 10 Las pautas posológicas adecuadas incluyen la administración de partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención en más de una sola dosis diaria. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en dos dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 2000 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en dos dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 20 mg a 1000 mg. En algunos ejemplos y ejemplos de referencia, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en dos dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 160 mg a 600 mg. Por ejemplo, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en dos dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 200 mg a 500 mg. Por ejemplo, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en dos dosis diarias, donde cada dosis es de aproximadamente 500 mg.
- 15 20 Las pautas posológicas adecuadas incluyen la administración de partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención en tres dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 1500 mg. Por ejemplo, en algunos ejemplos y ejemplos de referencia, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en tres dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de aproximadamente 20 mg a 500 mg. Por ejemplo, en algunos ejemplos y ejemplos de referencia, las partículas y/o formas purificadas de un Compuesto de la invención se administran en tres dosis diarias, donde cada dosis está en un intervalo de 25 160 mg a 500 mg.
- 30 Se ha demostrado que una pauta posológica en la que los sujetos humanos recibieron aproximadamente 500 mg de Compuesto 1 dos veces al día (es decir, 1000 mg de dosis diaria total) ha conseguido la mejor farmacocinética selectiva en casi todos los pacientes tratados. Se ha demostrado que esta pauta posológica, a la que se hace referencia en el presente documento como 500 mg BID, tiene las propiedades farmacocinéticas deseadas del Compuesto 1 en seres humanos (Figura 20).
- 35 40 En una pauta posológica a modo de ejemplo de referencia, se administran 500 mg del Compuesto 1 tres veces al día (TID) a sujetos humanos. Aunque el nivel de exposición del Compuesto 1 no se mejora significativamente con una dosificación de tres veces al día en comparación con una dosificación de dos veces al día, la dosificación TID aumenta el tiempo de exposición del fármaco en seres humanos. Se ha demostrado que esta pauta posológica, a la que se hace referencia en el presente documento como 500 mg TID, tiene una buena tolerabilidad en seres humanos sin eventos adversos significativos observados relacionados con el fármaco.
- 45 En otra pauta posológica adecuada más a modo de ejemplo o ejemplo de referencia, se administra una cantidad aproximadamente igual o superior a 20 mg de Compuesto 1 una vez al día a sujetos humanos. Se ha demostrado que esta pauta posológica, a la que se hace referencia en el presente documento como 20 mg QD, presenta niveles terapéuticamente activos en pacientes, pero se elimina rápidamente de la sangre en seres humanos (Figura 21). Se ha demostrado que esta pauta posológica presenta una buena tolerabilidad en seres humanos y signos de actividad antitumoral potente en una lesión de cáncer de colon en el riñón debida a una concentración muy elevada del fármaco en la orina.
- 50 En otra pauta posológica adecuada más, el Compuesto 1 se administra con leche con el estómago vacío, lo cual proporciona una farmacocinética deseable (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto de la leche sobre la farmacocinética del Compuesto 1

Parámetro PK	En ayunas	Con leche	Factor de cambio
Cmáx (uM)	2,01	3,05	1,52
AUC _{0-24 h}	20,12	31,40	1,56
Cmáx (uM)	2,55	2,89	1,13
AUC _{0-24 h}	20,72	32,16	1,55

- 55 En otra pauta posológica adecuada más, el Compuesto 1 se administra con comida, lo que retrasa el Tmáx (Tabla 13).

Tabla 13. La ingesta del Compuesto 1 con comida provoca un retraso en el Tmáx

Paciente	Tmáx (h)		
	En ayunas	Con leche	Con comida
20	2	2	8
21	6	6	6
22	8	8	10
24	-	6,3	10
27	-	0,5	6
28	-	6	10

EJEMPLO 15: Los compuestos de naftofurano prolongan la supervivencia sin progresión

5 Se ha observado una prolongación de la supervivencia sin progresión (SSP) en pacientes con cáncer colorrectal avanzado que son refractarios a la quimioterapia (Figura 22). También se ha observado una prolongación de la supervivencia sin progresión en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de mama triple negativo, melanoma, cáncer adrenocorticoide y cáncer de pulmón.

10 Una concentración del fármaco en sangre para el Compuesto 1 por encima de 1 uM se correlacionó con un aumento en la supervivencia sin progresión (Figura 23) en pacientes con diversos cánceres, que incluyeron el colorrectal, gástrico, de cabeza y cuello, melanoma, condrosarcoma, de pulmón, próstata, ovario, adrenocorticoide y angiosarcoma.

EJEMPLO 16: Perfil farmacocinético del Compuesto 1

15 Se observó que el Compuesto 1 era igualmente tóxico para las células cancerosas y las células normales, y se concluyó que no era un candidato potencial para tratar el cáncer (K. Hirai K. *et al.*, *Cancer Detection and Prevention*, 23(6) (1999) 539-550; Takano A. *et al.*, *Anticancer Research* 29:455-464, 2009). Los estudios descritos en el presente documento descubrieron que, en contra de lo que cabría esperar, las células cancerosas y las células madre cancerosas requieren una exposición mucho más corta que las células normales para ser destruidas por el Compuesto 1. Las células normales pueden tolerar hasta 24 horas de exposición al Compuesto 1. Además, los estudios del presente documento descubrieron que las células normales se pueden recuperar después de un período corto de exposición sin fármacos, mientras que las células cancerosas no se pueden recuperar una vez que se han expuesto a una determinada concentración del Compuesto 1 durante al menos 2 horas. Sobre la base de estos estudios, se diseño una exposición farmacocinética especial [denominada perfil farmacocinético selectivo (PFS) o perfil farmacocinético preferido (PFP), que se utilizan indistintamente en esta publicación] para el Compuesto 1 utilizando los datos que se muestran a continuación en la Tabla 14 para conseguir una actividad antitumoral selectiva en los pacientes (Figura 24).

30 **Tabla 14. Uso del tamaño de partícula para conseguir la exposición farmacocinética (PK) preferida con el fin de aumentar la concentración del fármaco en plasma y reducir la toxicidad para las células normales**

Tiempo de tratamiento	Cl ₅₀ para el Compuesto 608 (uM)					
	Células normales				Células cancerosas	
	CD34 ⁺ eritroides de médula ósea	CD34 ⁺ mieloides de médula ósea	PMBC	DU145	HT29	
4-12 h				< 0,2	< 0,5	
12-24 h	> 30	> 30	14	< 0,2	< 0,5	
72 h			3			

35 Una exposición adecuada del PFS o PFP para un Compuesto de la invención tal como el Compuesto 1, partículas y/o formas purificadas de este, es de al menos 1,0 μ M o superior durante al menos 2 horas y la concentración del fármaco en sangre debe eliminarse sustancialmente dentro de un período de 24 horas.

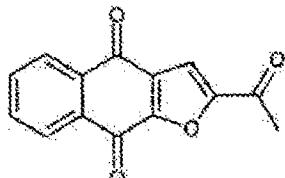
Por ejemplo, el paciente mantiene una exposición a una concentración de un Compuesto de la invención tal como el Compuesto 1, partículas y/o formas purificadas de este de al menos 1,5 μ M durante un período de tiempo definido, preferentemente al menos 2 horas y el fármaco debe eliminarse sustancialmente dentro de un período de 24 horas.

40 Una exposición más prolongada al compuesto puede provocar toxicidad y/o pérdida de selectividad.

- 5 Para conseguir este PFS o PFP deseado, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto, p. ej., un paciente, en el intervalo de al menos aproximadamente 0,02 μ M a aproximadamente 30 μ M. Por ejemplo, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto de al menos aproximadamente por encima de 0,5 μ M durante un tiempo de al menos 2 horas, pero inferior a 24 horas. Por ejemplo, un Compuesto de la invención se puede administrar en una dosis para conseguir una concentración de compuesto en sangre en un sujeto de al menos aproximadamente 2 μ M durante un tiempo de al menos 2 horas, pero inferior a 24 horas.
- 10 Preferentemente, las células cancerosas se deben exponer a un Compuesto de la invención tal como el Compuesto 1, partículas y/o formas purificadoras de este, durante 4 horas a una concentración superior a 0,2 μ M con el fin de inducir la muerte de las células cancerosas. Sin embargo, una exposición prolongada no contribuye significativamente a la eficacia de un Compuesto de la invención tal como el Compuesto 1, partículas y/o formas purificadoras de este, a la hora de destruir las células cancerosas. El Compuesto 1 exhibió una actividad selectiva a la hora de destruir las células cancerosas y preservar las células normales cuando la concentración del Compuesto 1 se mantuvo desde por encima de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3 μ M durante menos de 24 horas. Un tamaño de partícula reducido del Compuesto 1 consiguió este patrón farmacocinético preferido y una actividad selectiva.
- 15 20 La actividad selectiva del Compuesto 1 a la hora de destruir las células cancerosas y preservar las células normales se representa mediante los datos de la Tabla 14 y se ilustra en la Figura 24. La exposición de las células cancerosas al Compuesto 1 en concentraciones de aproximadamente 0,2 o superiores y 30 μ M durante de aproximadamente 4 horas hasta como máximo aproximadamente 24 horas mostró una destrucción selectiva de las células cancerosas y la preservación de las células normales. La exposición continuada a estas concentraciones durante períodos superiores a 24 horas dio como resultado una pérdida de selectividad, ya que las células normales también se dañaron. La exposición al Compuesto 1 en concentraciones en sangre inferiores a 0,5 μ M no produjo la destrucción de las células cancerosas, independientemente de la cantidad de tiempo de exposición.
- 25 30 Las pautas posológicas descritas en el presente documento exhiben este patrón PK preferido. Por ejemplo, la PK exhibida en pacientes que recibieron 500 mg BID es este patrón de exposición PK preferido (Figura 20) que muestra una exposición sostenida del Compuesto 1 por encima de los niveles terapéuticos con una eliminación sustancial del fármaco en 24 horas. De 80 mg BID a 200 mg BID, se consiguió el PFS o PFP en los pacientes con una concentración del fármaco en plasma dependiente del aumento de la dosis. Para 300 mg BID y 400 mg BID, parece ser que la concentración del fármaco en plasma presentó un aumento adicional limitado por encima de 200 mg BID. Sin embargo, 35 se observó que 500 mg BID pueden ayudar sorprendentemente a reducir la variación entre pacientes, es decir, todos los pacientes tratados pueden conseguir el PFS con una concentración del fármaco en plasma suficientemente elevada (Figura 12). Por último, los pacientes con una exposición del Compuesto 1 por encima de 1,6 μ M durante al menos 4 horas muestran una mejora en la supervivencia sin progresión, lo que demuestra que este patrón de exposición conduce a una eficacia mejorada en seres humanos. Una exposición PK del Compuesto 1 por encima de 40 1 μ M se correlaciona con un aumento en la supervivencia sin progresión (Figura 23) en pacientes con diversos cánceres, que incluyen el colorrectal, gástrico, de cabeza y cuello, melanoma, condrosarcoma, de pulmón, próstata, ovario, adrenocorticoide y angiosarcoma. Estos datos son muy diferentes de lo que cabría esperar de los experimentos preclínicos. En los estudios preclínicos, se demostró que el Compuesto destruía las células cancerosas o células madre cancerosas con un valor de C_{150} de aproximadamente 100 a 200 nM. Sin embargo, se observó clínicamente en 45 los pacientes que estas concentraciones no están asociadas con la actividad clínica. Por el contrario, la concentración en plasma debe llegar a más de 1 μ M para obtener signos de actividad. Un aumento adicional de la concentración del fármaco en plasma hasta aproximadamente 2 μ M o 3 μ M o más se asocia con signos mejorados de la actividad antitumoral.
- 50 55 Las realizaciones ilustradas y analizadas en esta memoria descriptiva están destinadas únicamente a enseñar a los expertos en la técnica la mejor manera conocida por los inventores para preparar y utilizar la invención. Todos los ejemplos presentados son representativos y no limitantes. Las realizaciones descritas anteriormente de la invención se pueden modificar o variar, sin alejarse de la invención, como apreciarán los expertos en la técnica teniendo en cuenta el contenido anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura



5 o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable de este para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en donde el método comprende la administración oral del compuesto con una dosis diaria total en un intervalo de aproximadamente 160 mg a 1000 mg y en donde el compuesto está en forma particulada y las 10 partículas tienen un valor de D_{50} superior o igual a 0,2 μm e inferior o igual a 20 μm , en donde el análisis del tamaño 15 de partícula de las partículas se realiza utilizando un método de partículas secas.

10 2. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se formula para una administración con una dosis diaria total en un intervalo de 160 mg a 1000 mg, o de 320 mg a 1000 mg, o de 400 mg 15 a 1000 mg.

15 3. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se formula para una administración en dos dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de 160 mg a 1000 mg, o en donde 20 el compuesto se administra al sujeto en tres dosis diarias, donde la dosis diaria total está en un intervalo de 240 mg a 480 mg.

25 4. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el compuesto se formula para una administración en dos dosis diarias, y en donde cada dosis está en un intervalo de 80 mg a 500 mg, opcionalmente en donde cada dosis es de 500 mg.

5. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el compuesto se formula para una administración en tres dosis diarias, y en donde cada dosis está en un intervalo de 80 mg a 160 mg.

30 6. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se formula para una administración oral junto con leche con el estómago vacío.

7. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto 35 está en forma particulada, y en donde las partículas tienen un valor de D_{50} igual o inferior a 5 μm , o en donde las partículas tienen un valor de D_{50} igual o inferior a 3 μm .

8. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto está en forma particulada y 40 las partículas tienen un valor de D_{50} inferior o igual a 2 μm .

9. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es carcinoma colorrectal, cáncer 45 de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, angiosarcoma, adenocarcinoma gástrico y adrenocorticoide, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, tumor cerebral, leucemia, mieloma múltiple, cáncer gástrico, linfoma, meduloblastoma, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de vías biliares, cáncer de huesos, cáncer ocular (retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer de hipófisis, cáncer rectal, cáncer de glándulas salivales o cáncer nasofaríngeo.

10. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es cáncer refractario, cáncer 50 recidivante o cáncer metastásico.

11. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer está asociado con la 55 sobreexpresión de STAT3.

12. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se formula para la administración a un sujeto en el que se ha detectado un nivel de expresión de STAT3 en el tumor, donde el nivel de expresión de STAT3 se utiliza como biomarcador para la selección del paciente.

13. El compuesto para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el compuesto se formula como una o más dosis unitarias.

14. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde cada dosis unitaria comprende aproximadamente la dosificación total o una fracción de la dosificación del compuesto en cada dosis.
- 5 15. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se formula para proporcionar un perfil de liberación rápida, un perfil de liberación sostenida o una liberación retardada en un sujeto.

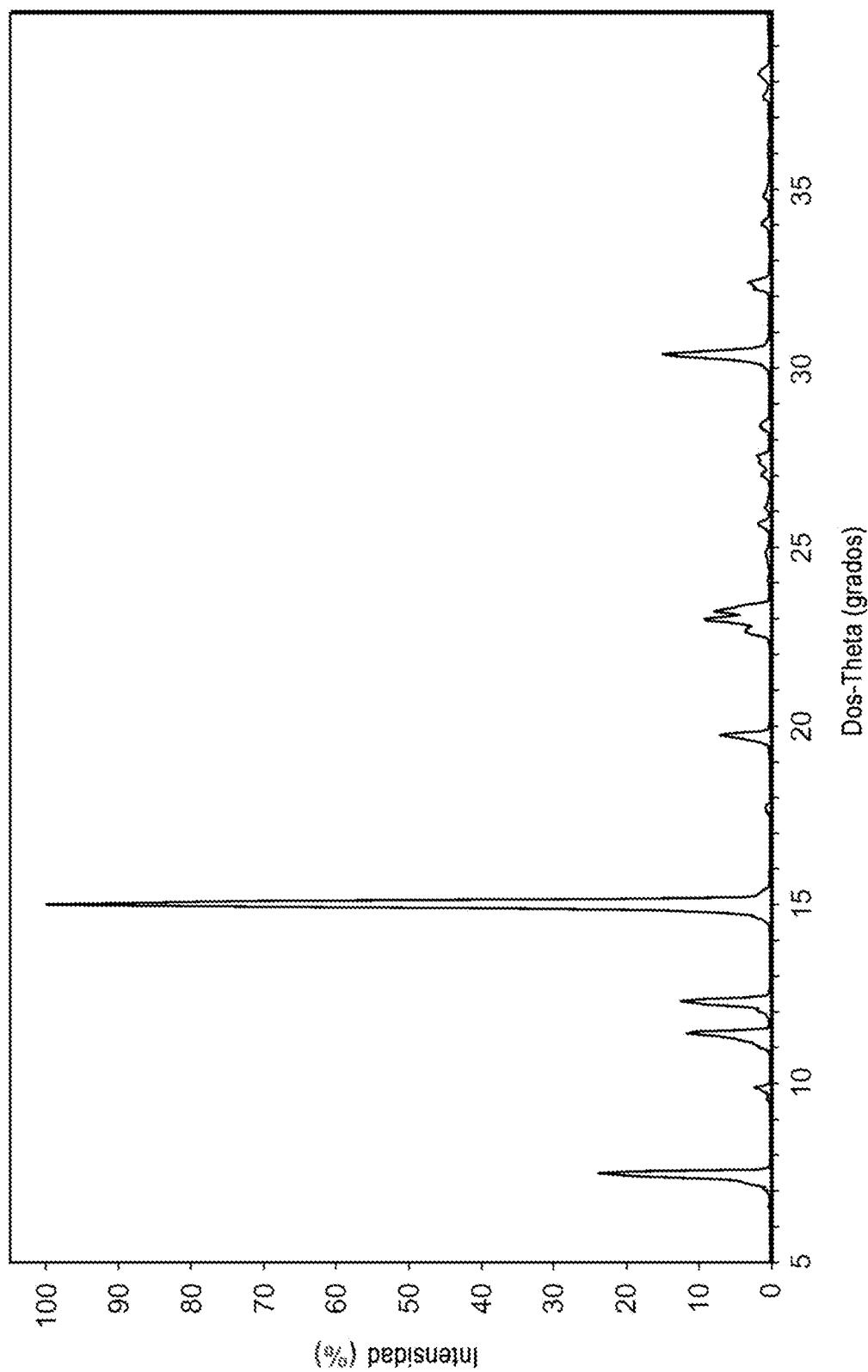
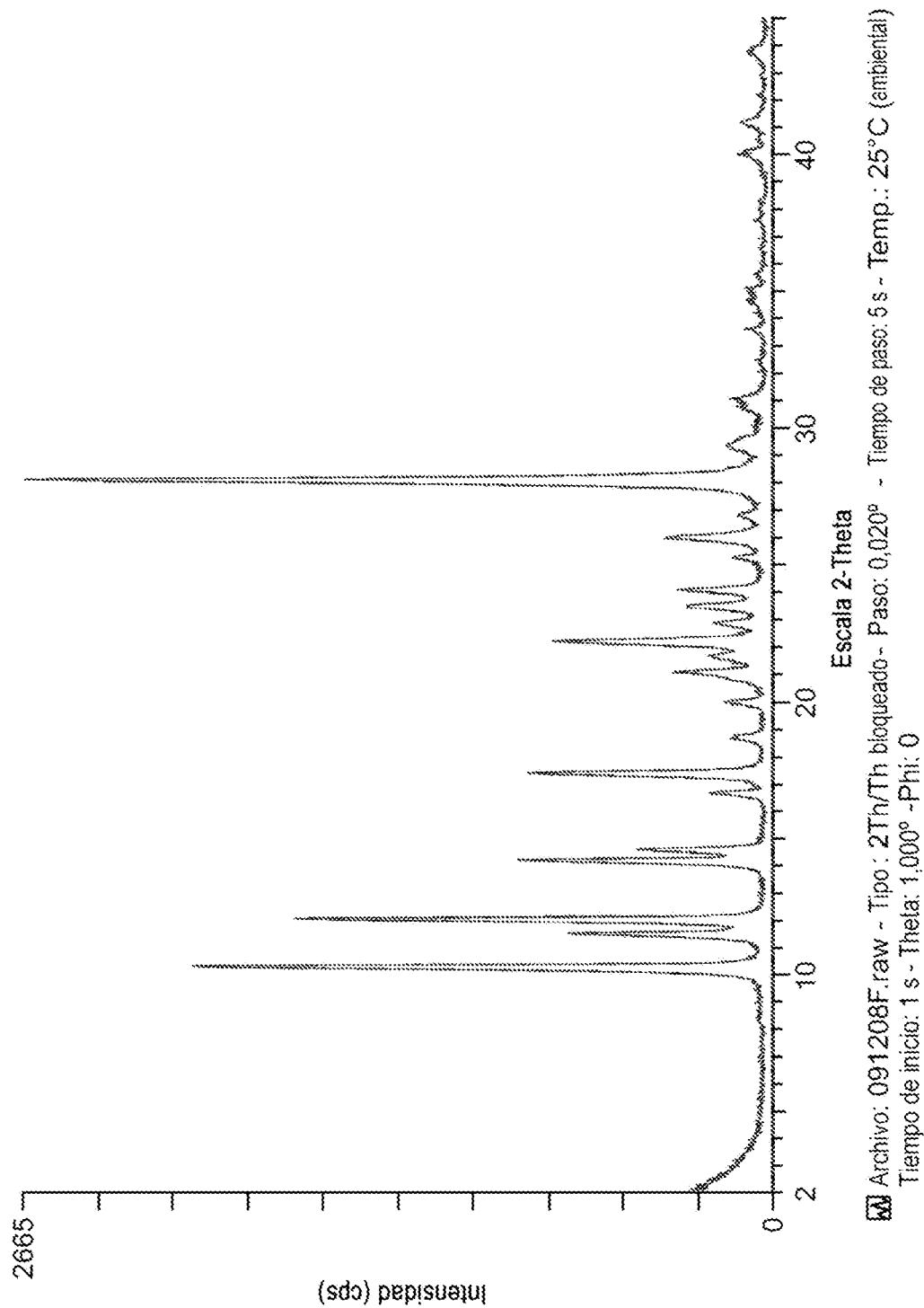
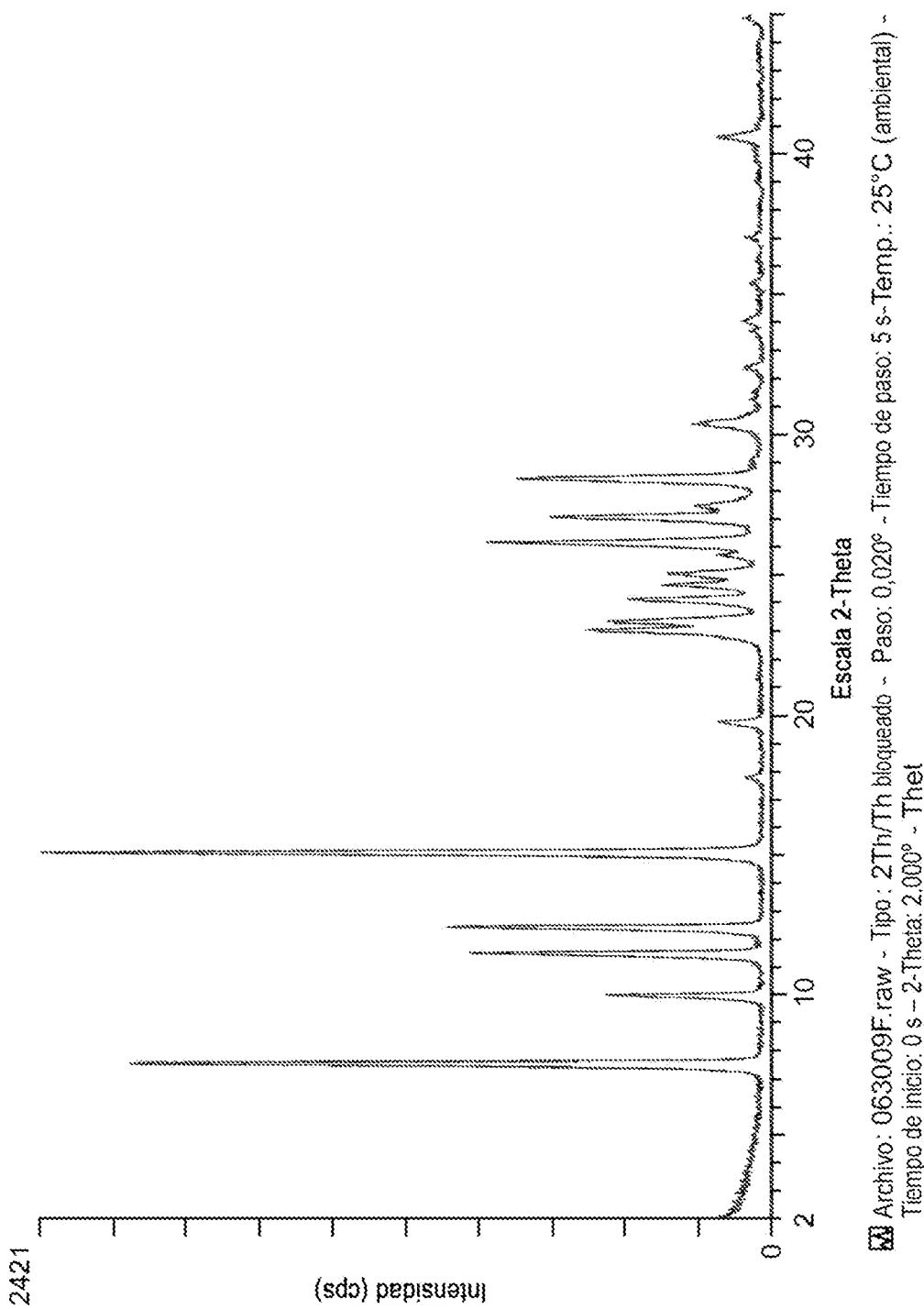


FIG. 1





三
〇
三

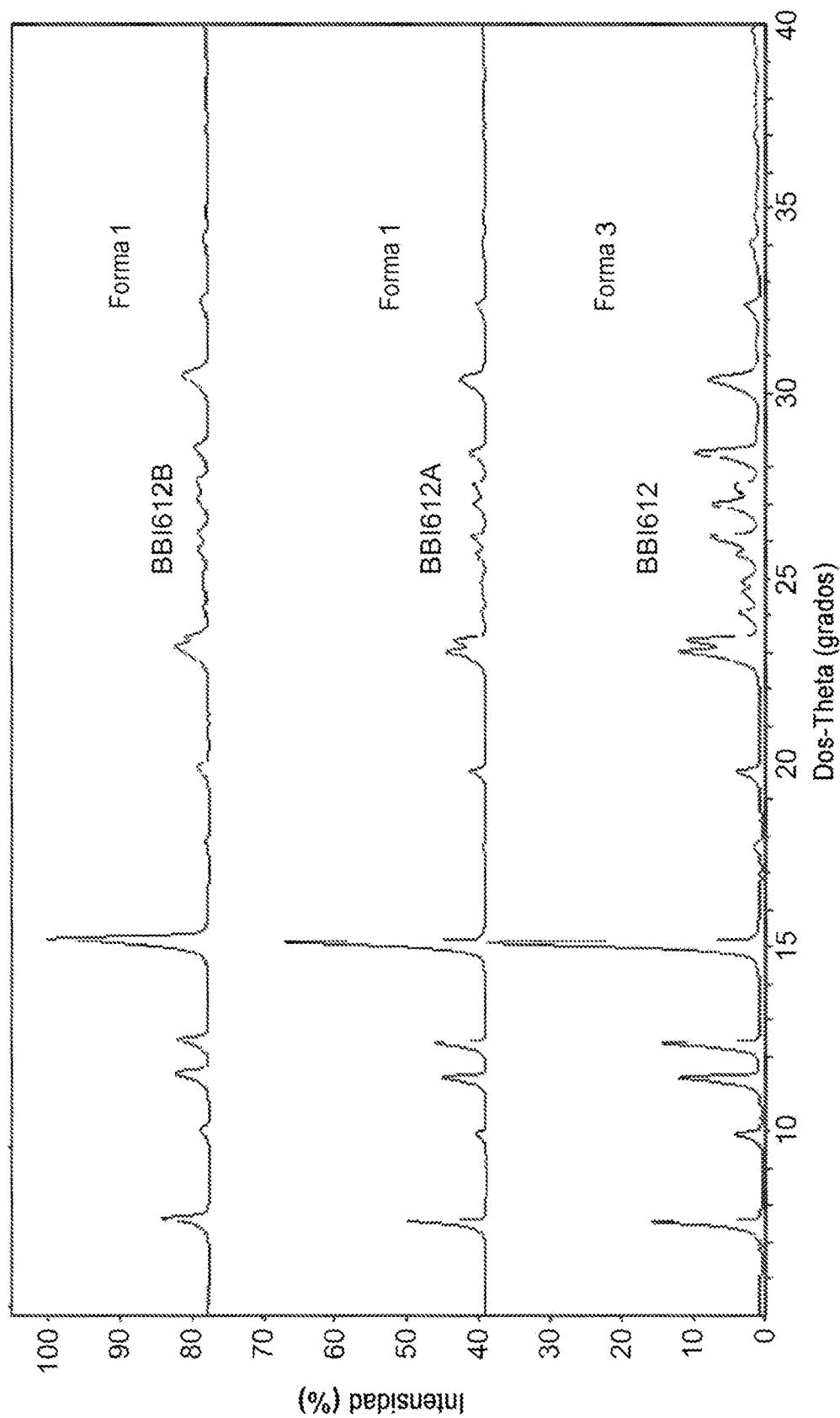
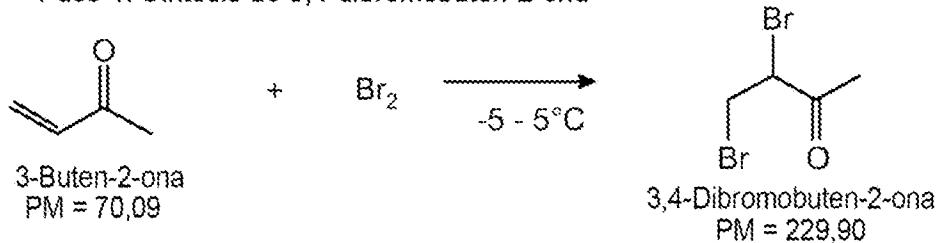


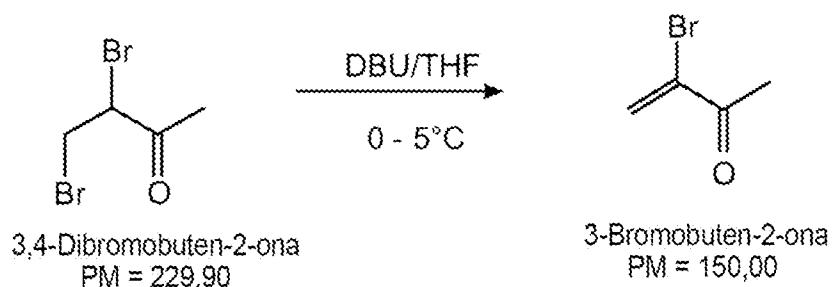
FIG. 4

Diagrama de flujo del proceso

Paso 1: Síntesis de 3,4-dibromobuten-2-ona



Paso 2: Desbromación de 3-bromobuten-2-ona



Paso 3: Síntesis del Compuesto 1

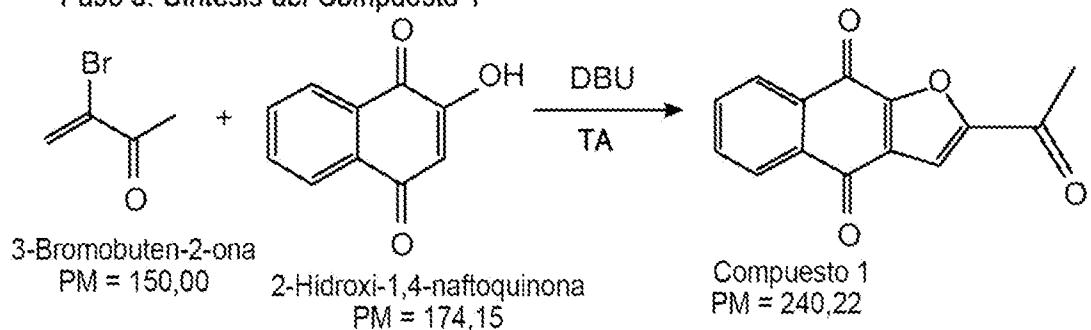


FIG. 5A

Diagrama de flujo del proceso

Diagrama de flujo del proceso para el Compuesto 1: Síntesis/aislamiento del crudo

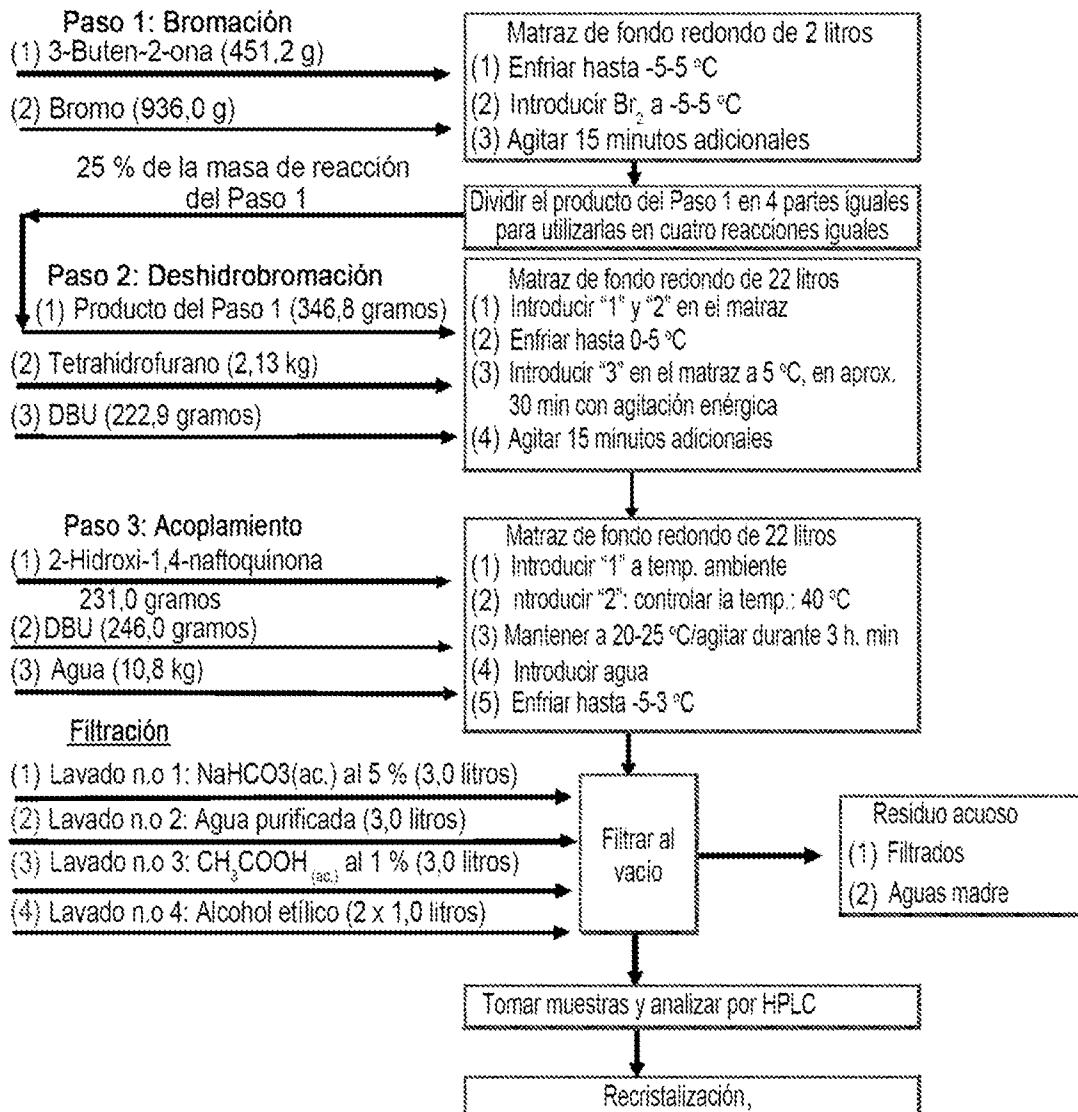


FIG. 5B

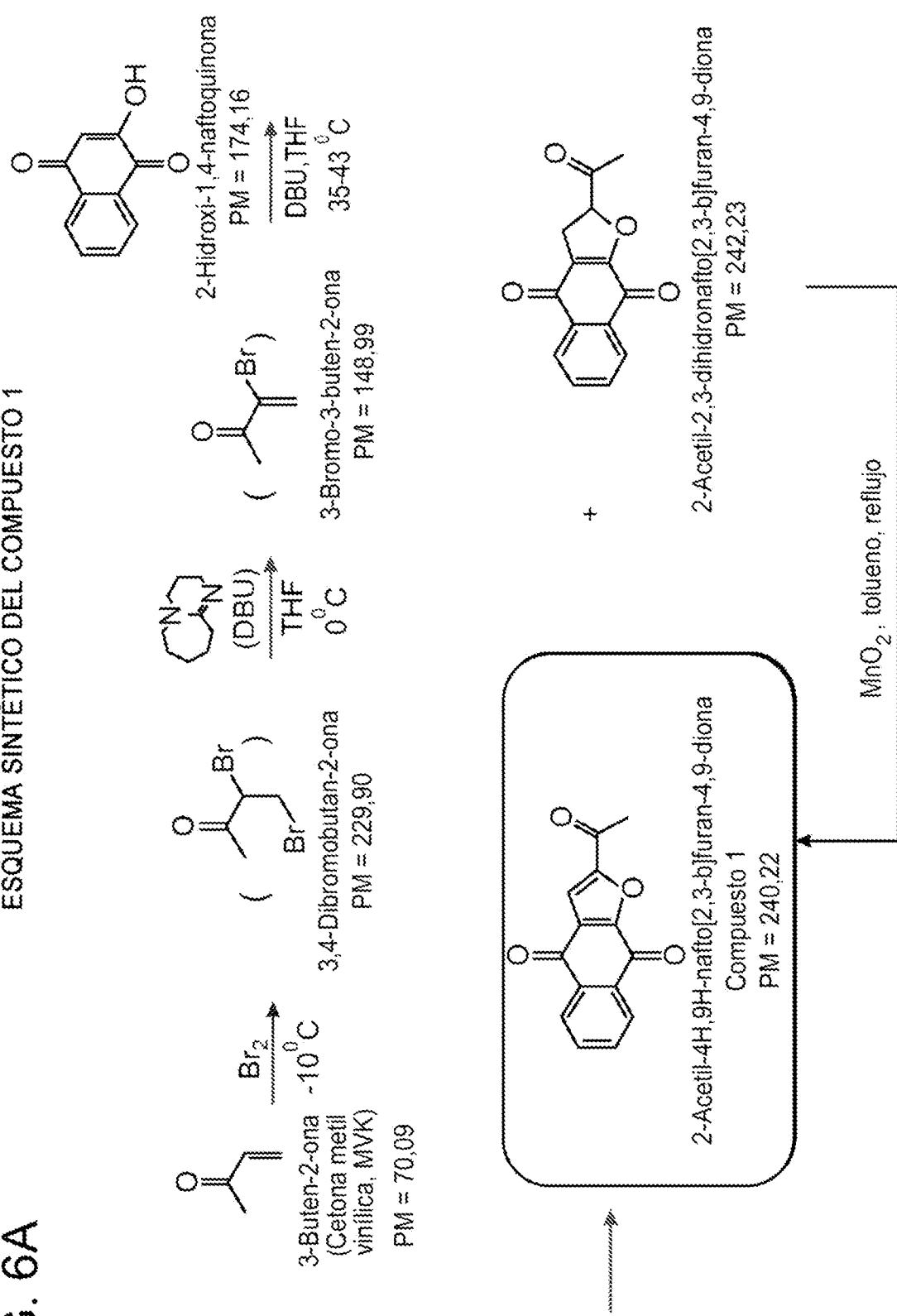
FIG. 6A
ESQUEMA SINTÉTICO DEL COMPLEJO 1

FIG. 6B

Diagrama de flujo del proceso: Paso 1: Síntesis del Compuesto 1 crudo

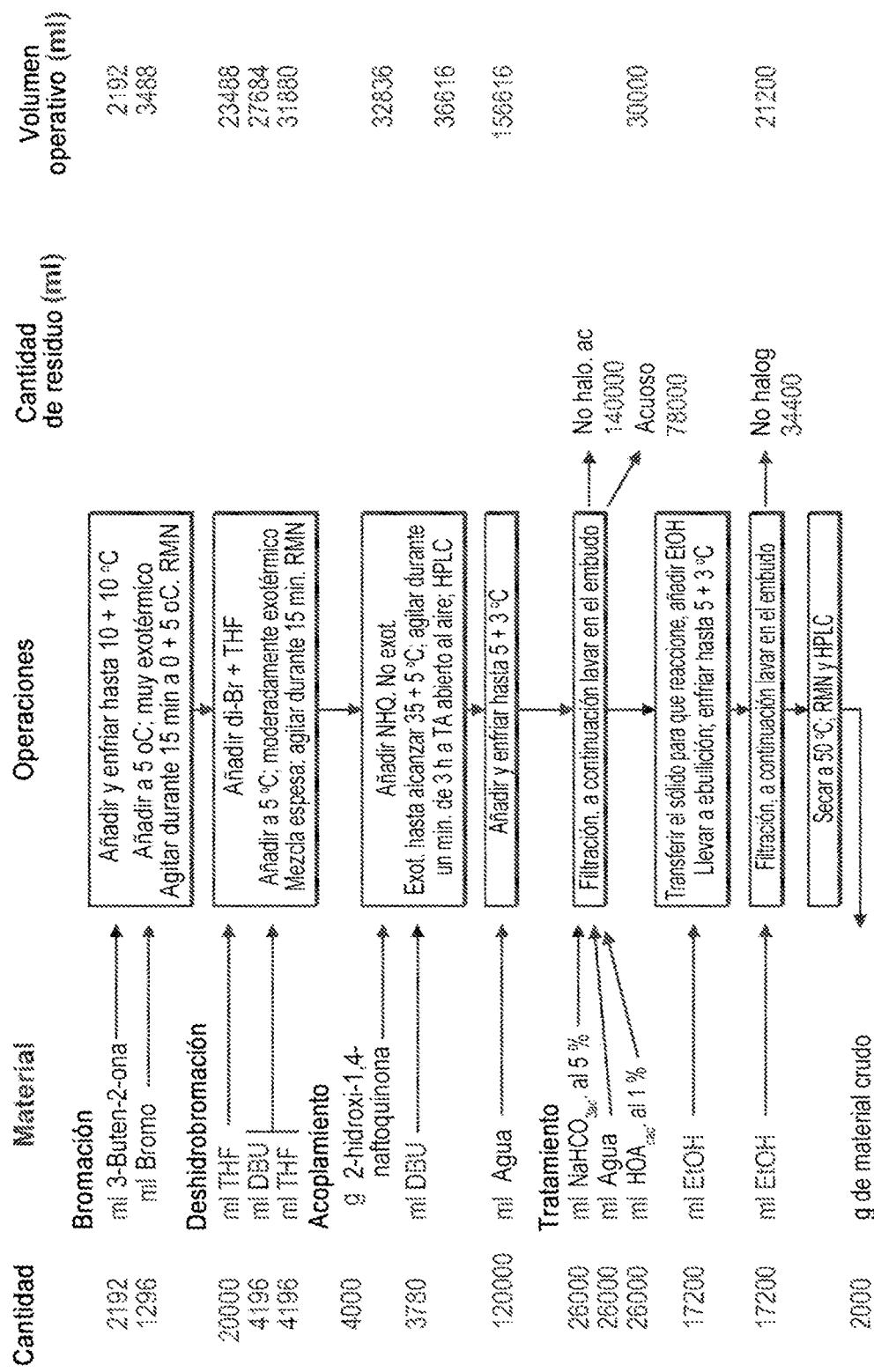


FIG. 6C

Diagrama de flujo del proceso: Paso 2: Oxidación/tratamiento con carbón activo

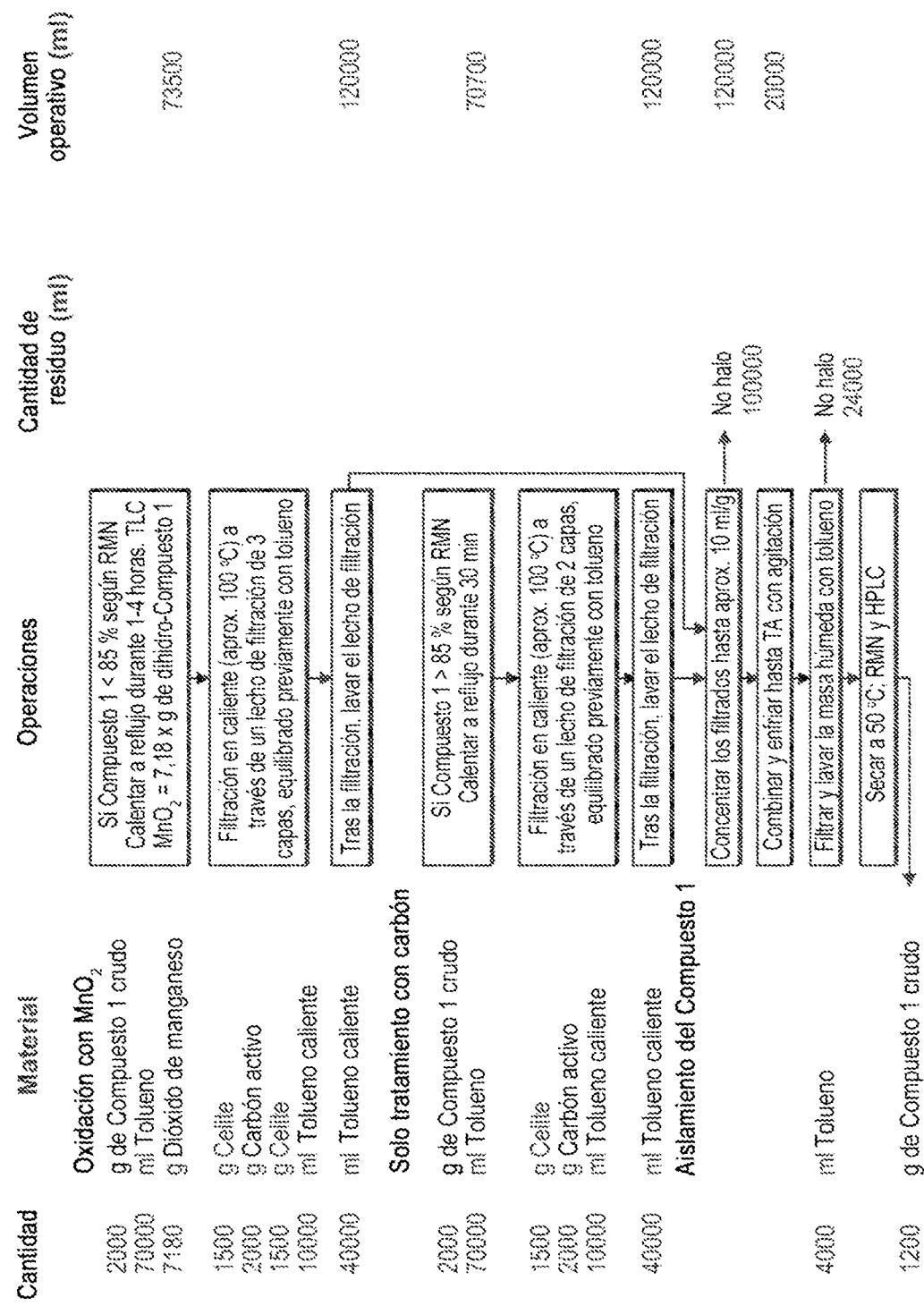
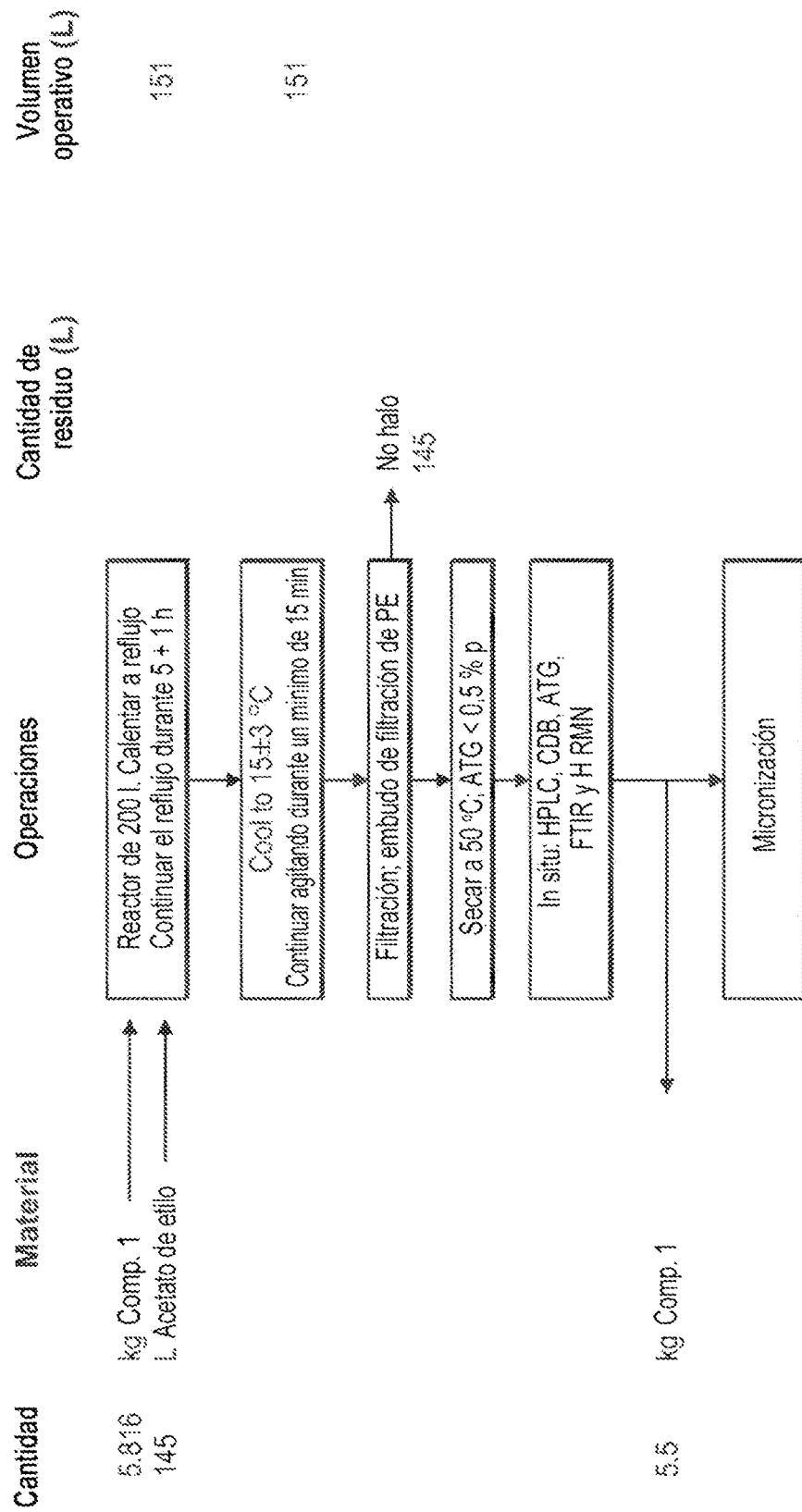
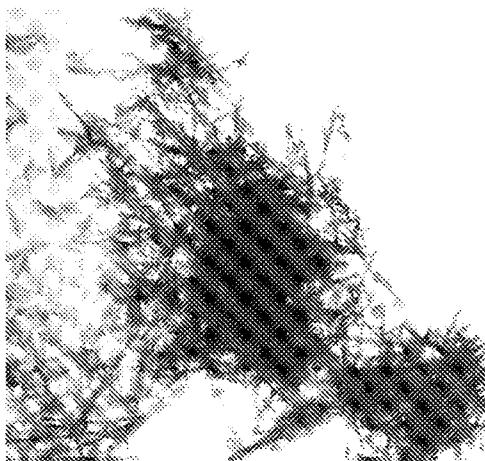


FIG. 6D

Diagrama de flujo del proceso: Paso 3: Tratamiento del Compuesto 1 con acetato de etilo



Forma cristalina 1



Forma cristalina 3

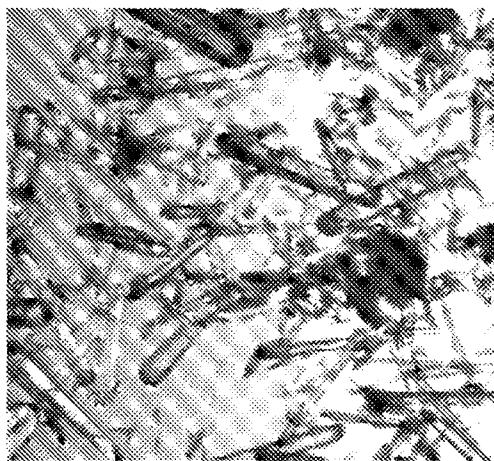


FIG. 7A

FIG. 7B

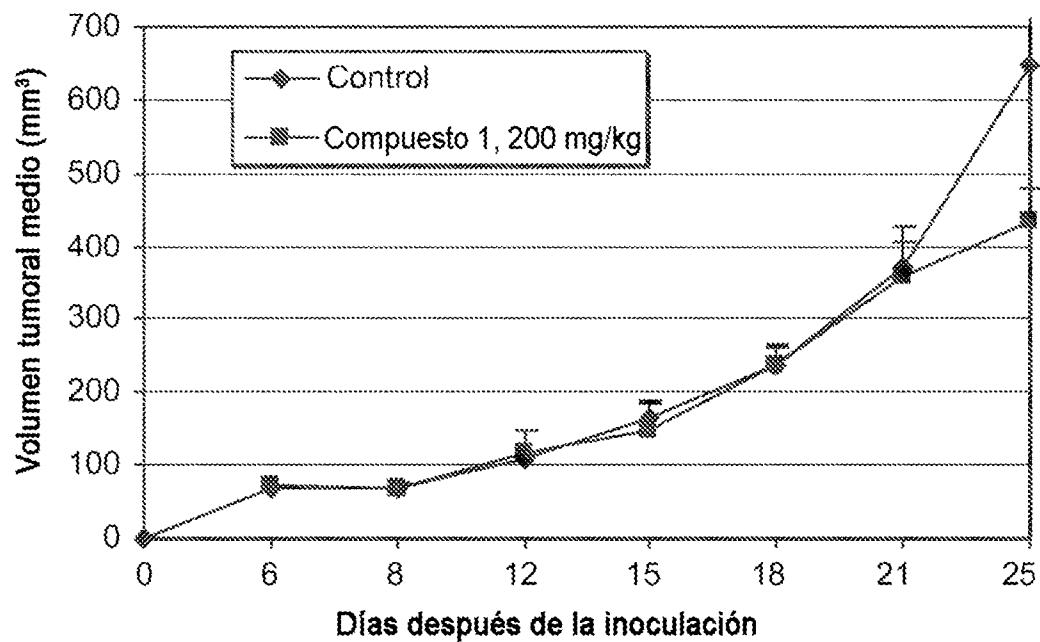


FIG. 8

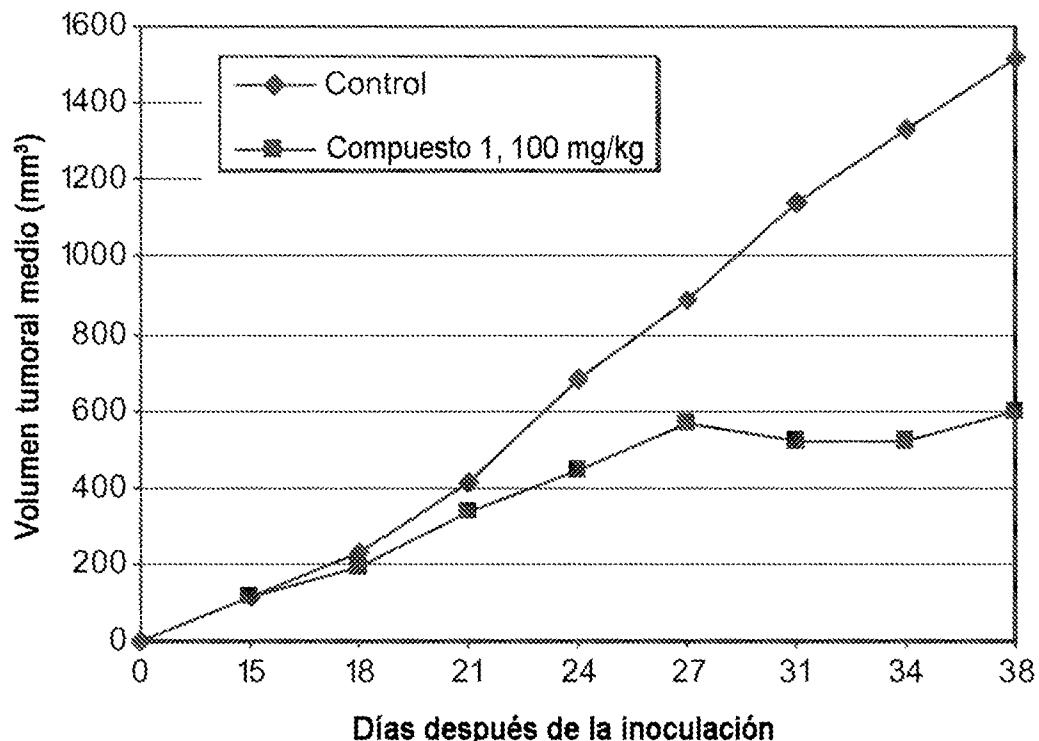


FIG. 9

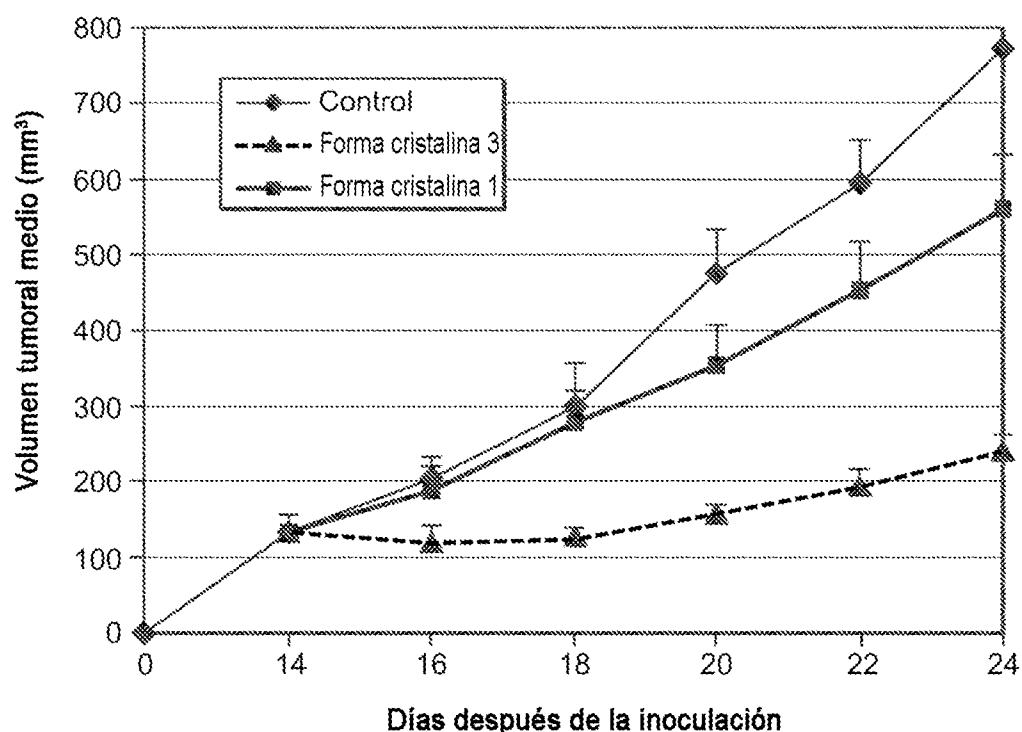


FIG. 10

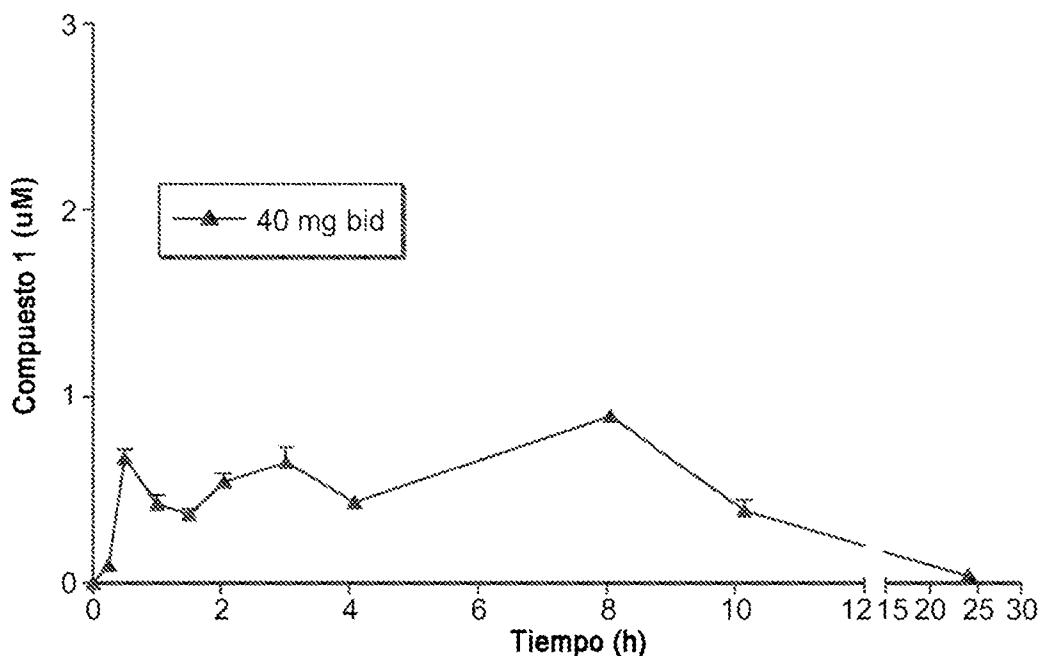


FIG. 11

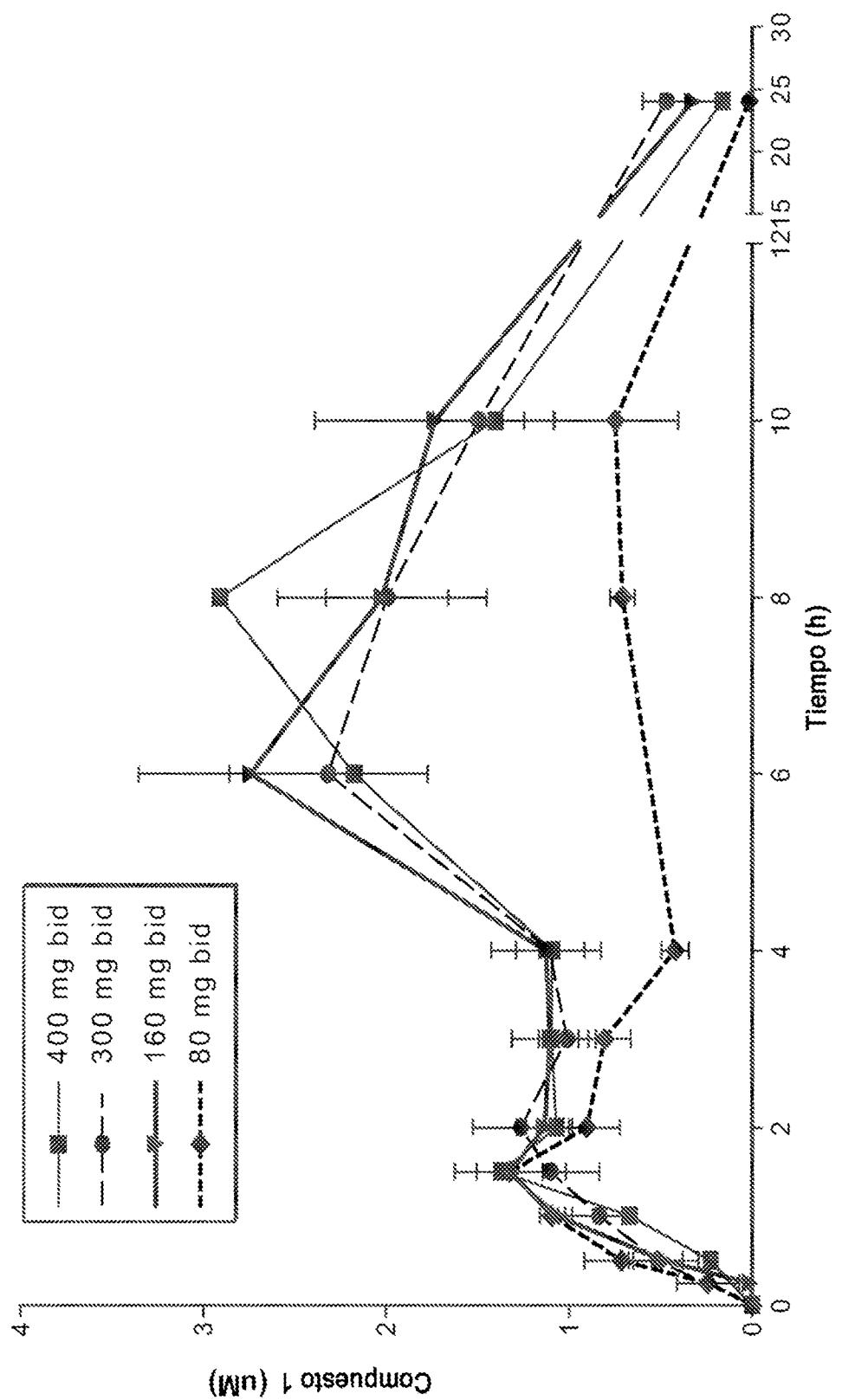


FIG. 12

FIG. 13

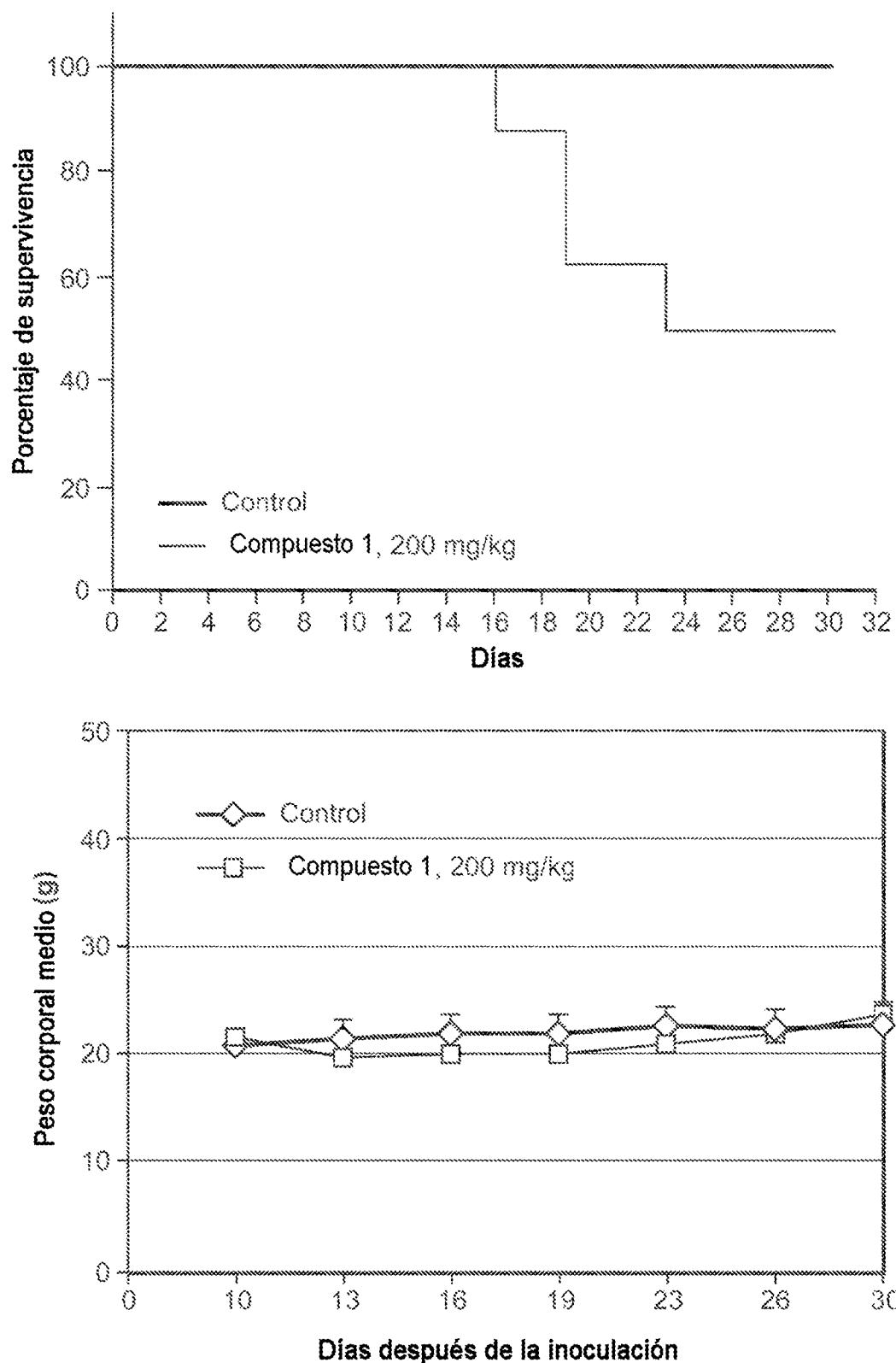


FIG. 13 CONT.

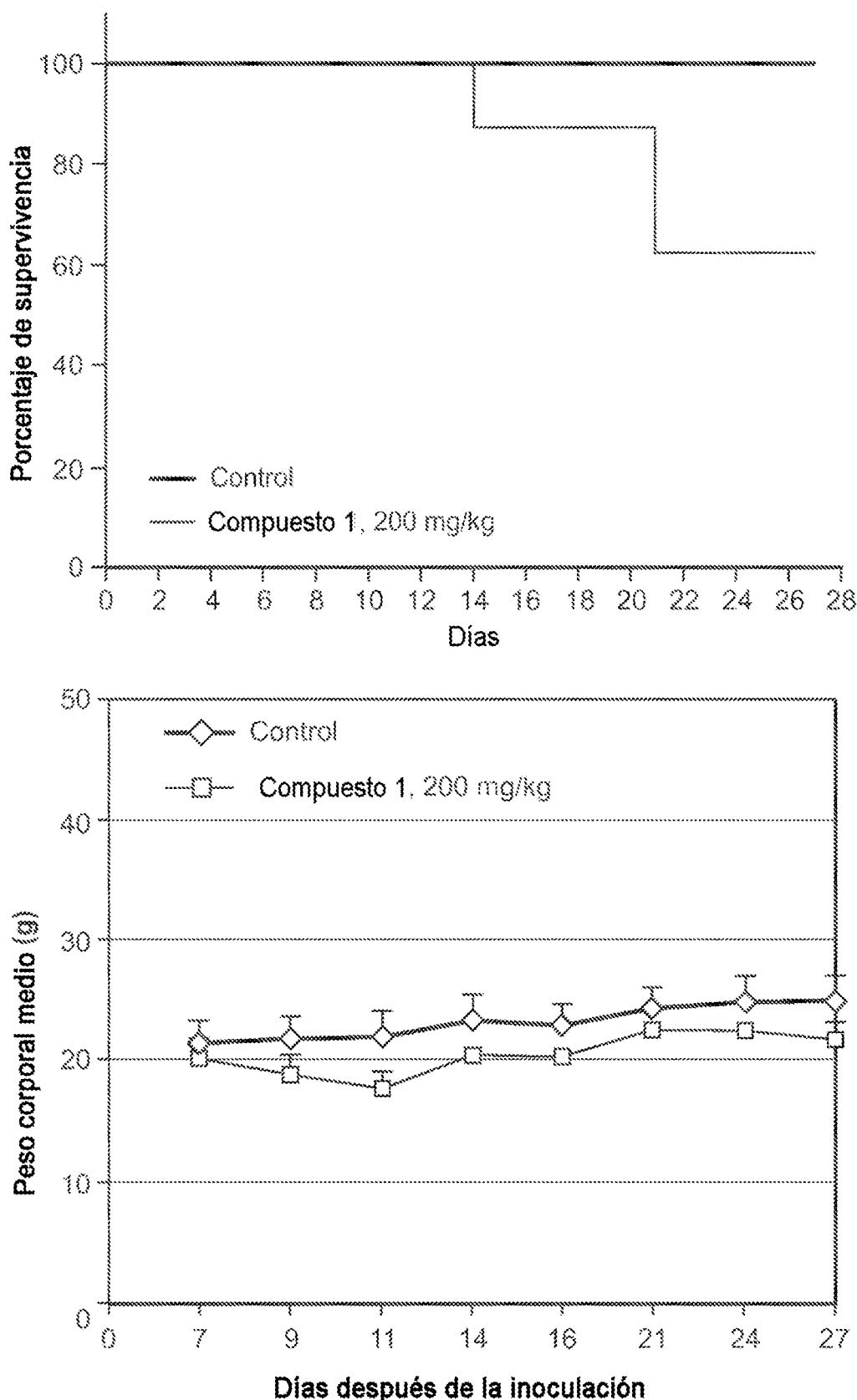


FIG. 14

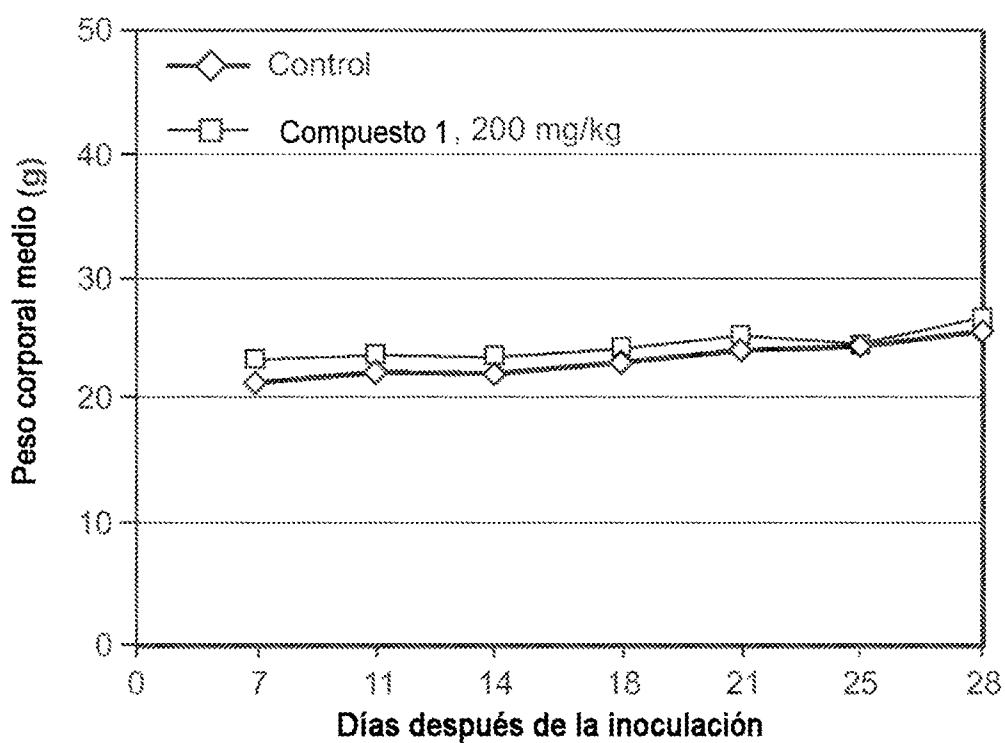
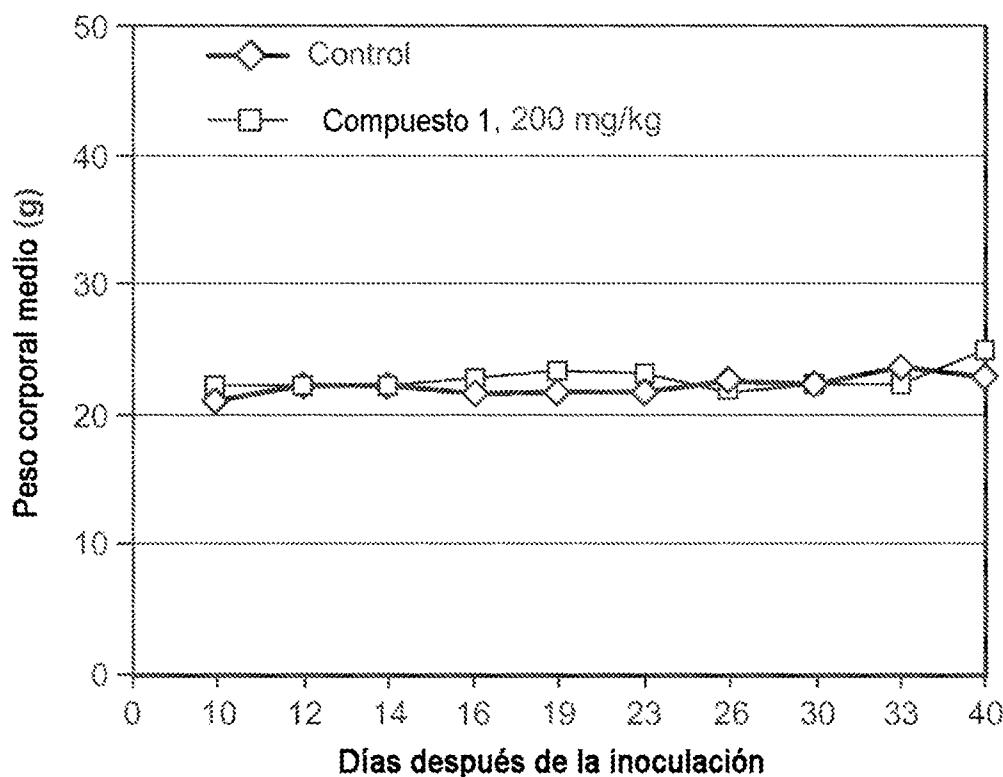
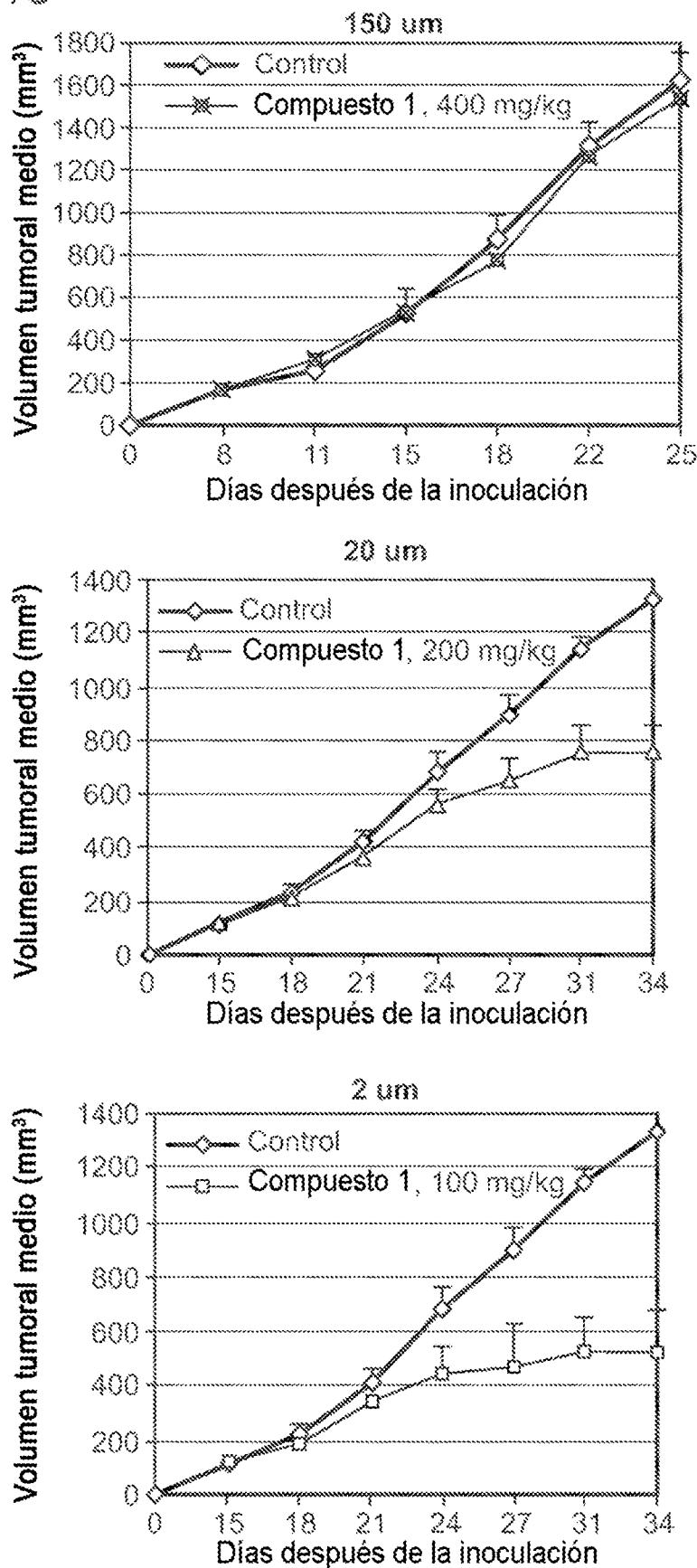


FIG. 15



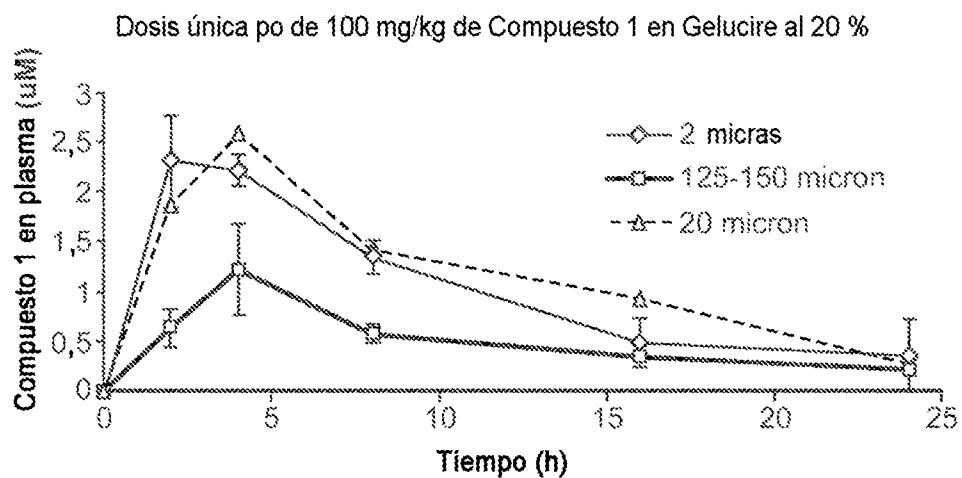


FIG. 16

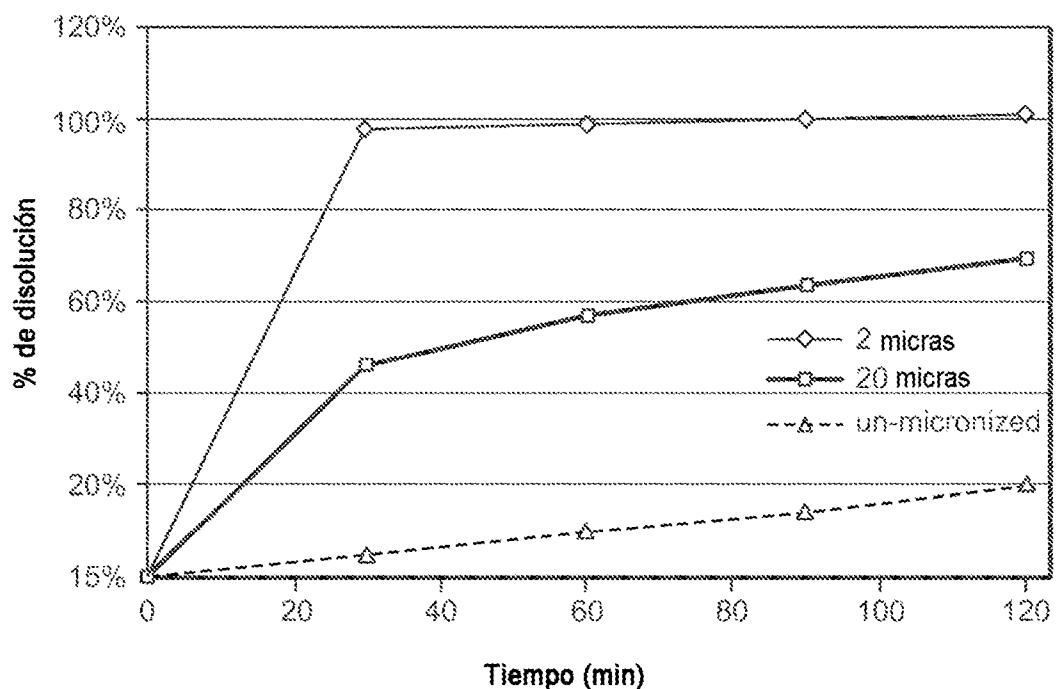


FIG. 17

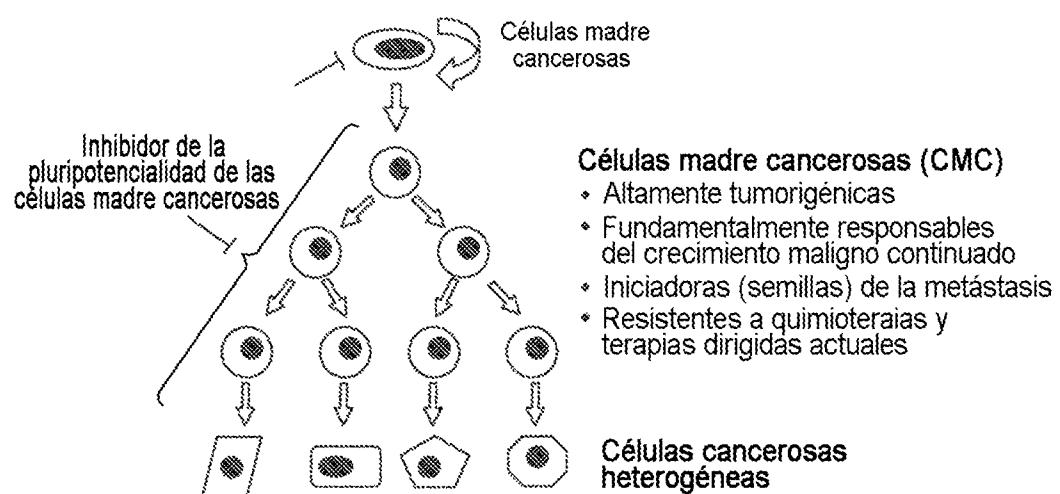


FIG. 18

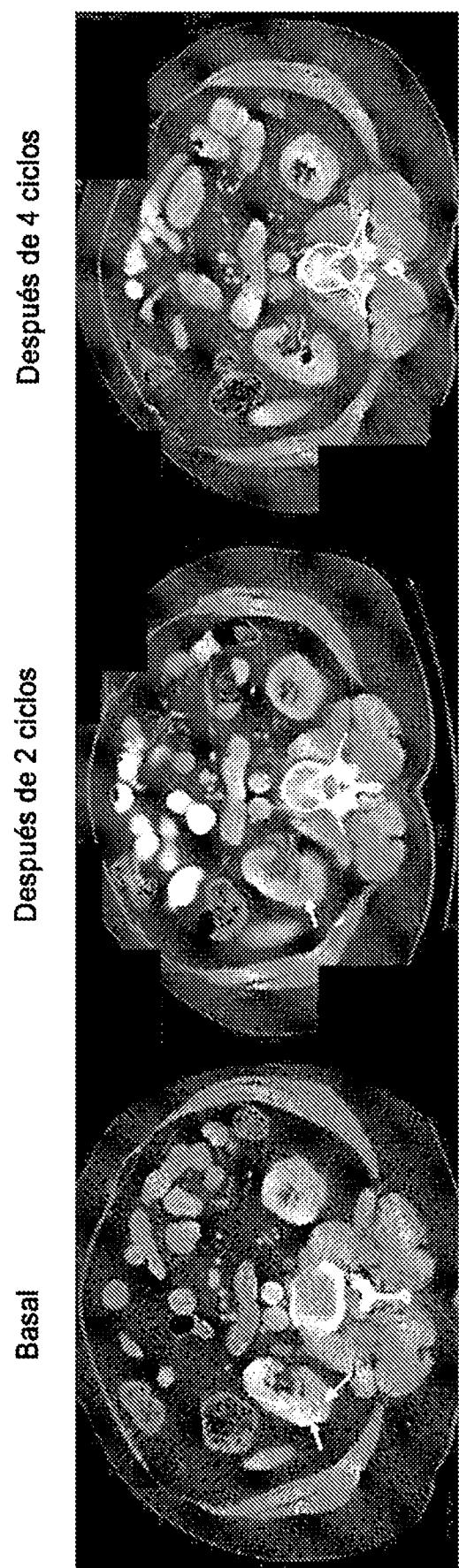


FIG. 19

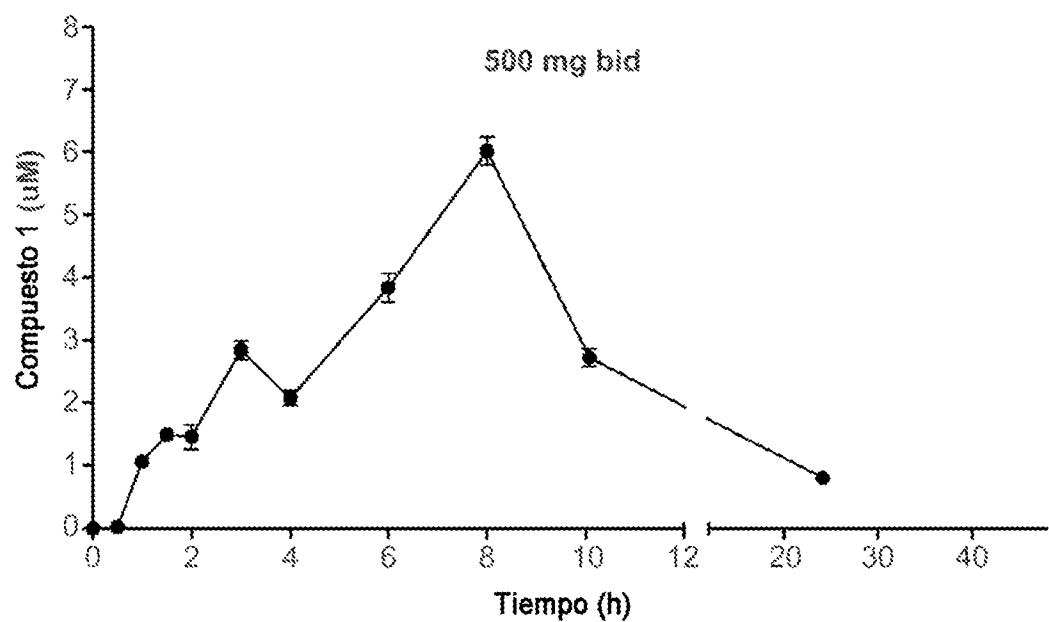


FIG. 20

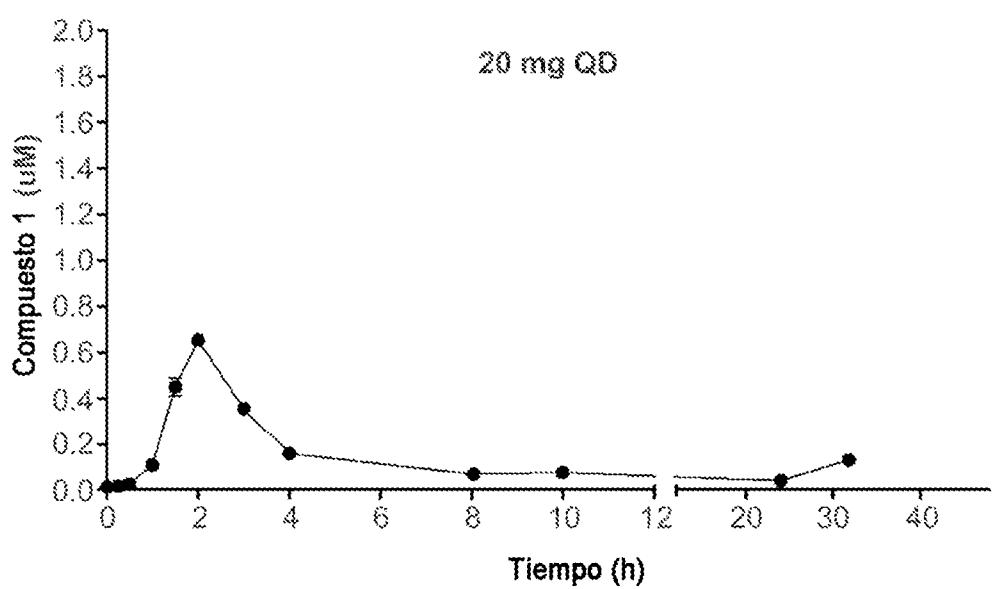


FIG. 21

FIG. 22

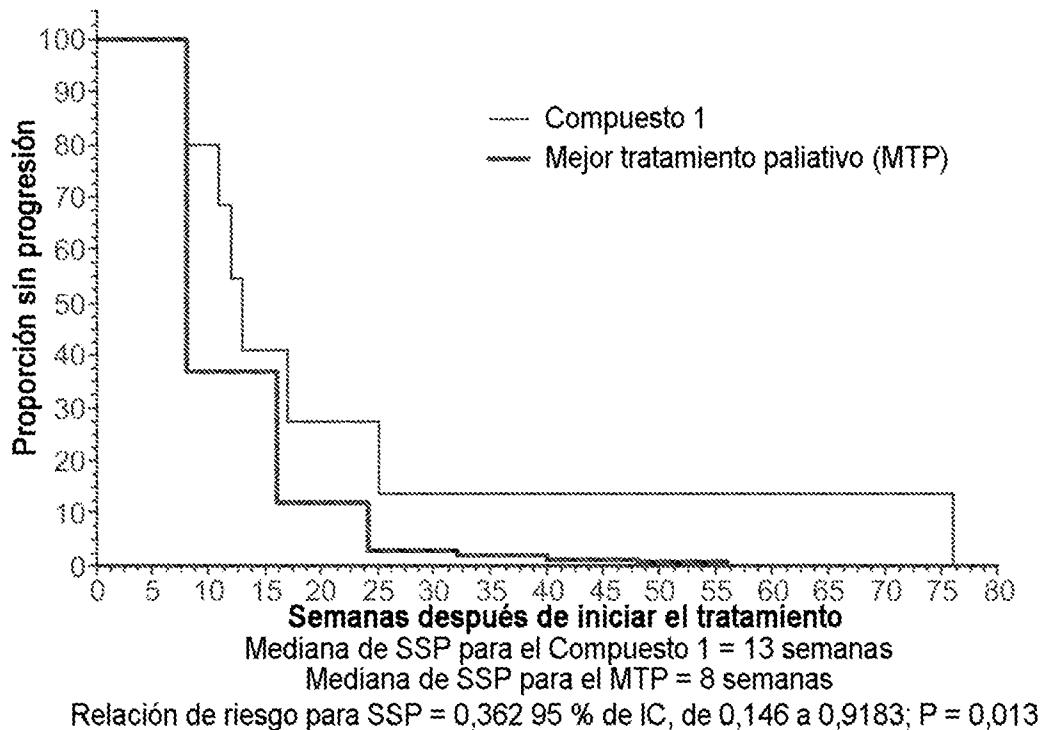
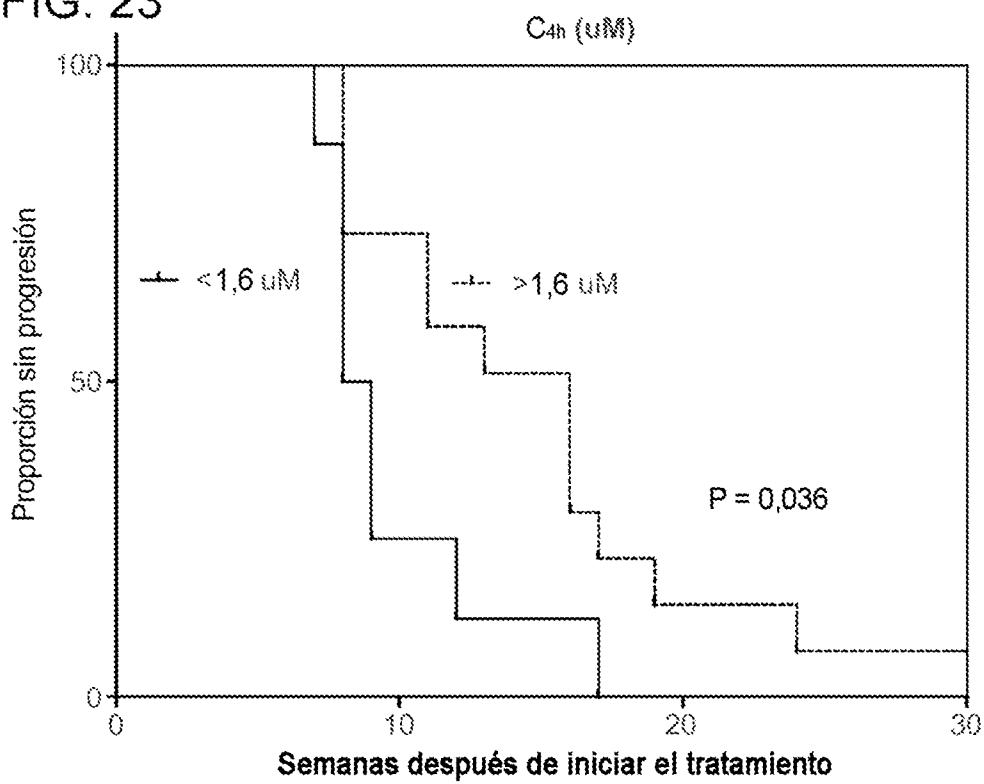


FIG. 23



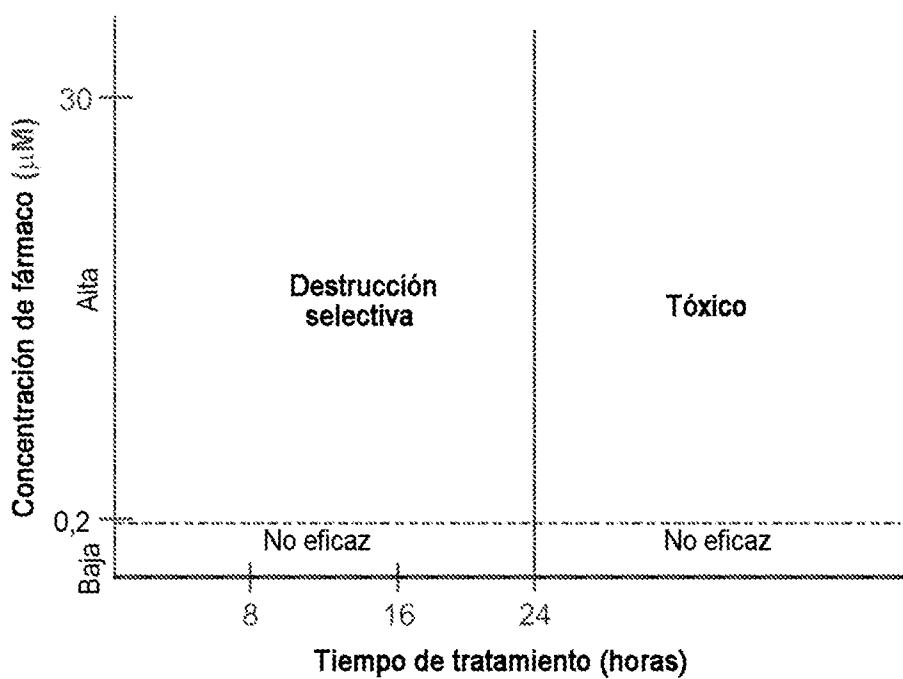


FIG. 24

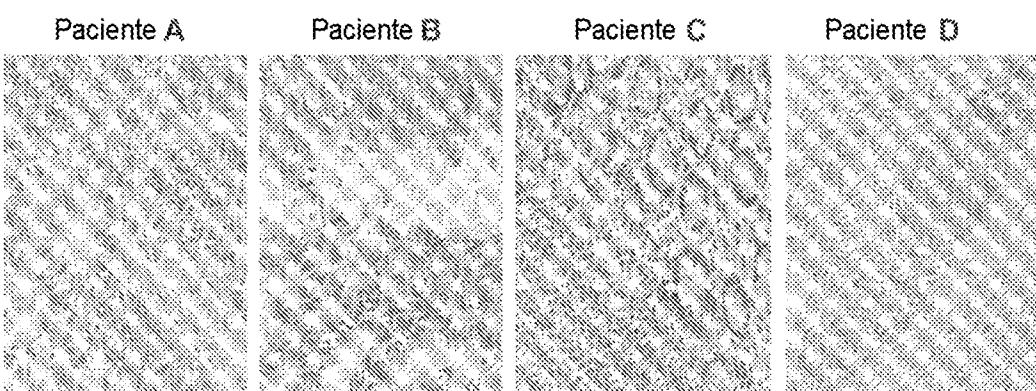


FIG. 25