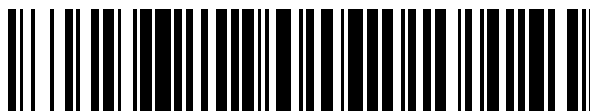


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 129**

51 Int. Cl.:  
**A01N 43/90** (2006.01)  
**A61K 31/522** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07735911 .5**  
96 Fecha de presentación: **15.05.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2154971**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2010**

54 Título: **Una combinación farmacéutica sinérgica para el tratamiento de cáncer**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.05.2012**

73 Titular/es:  
**PIRAMAL LIFE SCIENCES LIMITED  
PIRAMAL TOWER GANPATRAO KADAM MARG.  
LOWER PAREL  
MUMBAI 400 013 MAH, IN**

72 Inventor/es:  
**RATHOS, Maggie;  
JOSHI, Kalpana;  
KHANWALKAR, Harshal y  
SHARMA, Somesh**

74 Agente/Representante:  
**Ruo, Alessandro**

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).

ES 2 380 129 T3

## DESCRIPCIÓN

Una combinación farmacéutica sinérgica para el tratamiento de cáncer

## 5 Campo de la invención:

**[0001]** La presente invención se refiere a una nueva combinación farmacéutica para el tratamiento de cáncer mostrando dicha combinación un efecto sinérgico. La combinación farmacéutica comprende un agente antineoplásico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y al menos un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado de los compuestos de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos. La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento de cáncer, dicho método consiste en administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación.

## Antecedentes de la invención:

**[0002]** El cáncer es un término general usado para describir enfermedades en las que células anómalas se dividen sin control. Las células cancerosas pueden invadir tejidos cercanos y pueden extenderse a través del torrente sanguíneo y sistema linfático a otras partes del cuerpo. Existen diferentes tipos de cánceres tales como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del endometrio, cáncer de riñón (células renales), leucemia, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de piel, linfoma no de Hodgkin y melanoma. Actualmente existen más tratamientos disponibles para el cáncer que nunca, incluyendo quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal, inmunoterapia y terapia génica. La quimioterapia es el tratamiento usado habitualmente contra muchos tipos de cáncer. Los agentes quimioterapéuticos más ampliamente usados (los agentes antineoplásicos) incluyen paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, etopósido, carboplatino, cisplatino, topotecan y gemcitabina. Estos y otros agentes neoplásicos similares se han usado de forma exitosa para el tratamiento de diferentes cánceres. Sin embargo, con el transcurso del tiempo oportuno, se ha descubierto que algunos pacientes de cáncer desarrollan resistencia a monoterapia que implica el uso de tales agentes antineoplásicos convencionales. La tolerancia o resistencia a un fármaco representa un impedimento importante para el tratamiento exitoso. Dicha resistencia con frecuencia se considera intrínseca (es decir presente al comienzo del tratamiento) o adquirida (es decir se produce durante el transcurso de la quimioterapia). Un estudio que implicaba exposición de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano (NCI-H460) a concentraciones gradualmente crecientes de doxorubicina indicó la aparición de una nueva línea celular (NCI-H460/R) que era resistente a doxorubicina (96,2 veces) y resistente cruzada a etopósido, paclitaxel, vinblastina y epirubicina (J. Chemother., 2006 Feb; 18(1) 66-73). En otro estudio que describe la prevalencia de resistencia a quimioterapia *in vitro* en cultivos tumorales de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), se ha notificado resistencia a fármacos extrema o resistencia a fármacos intermedia a varios agentes antineoplásicos incluyendo cisplatino, doxorubicina, etopósido, gemcitabina, navelbina, paclitaxel, taxotere y topotecan (Ann. Thorac. Surg. 2006 Feb; 81 (2): 440-6; análisis 446-7). La gemcitabina se consideró el fármaco más clínicamente activo para el tratamiento de cáncer pancreático, sin embargo no mejoró significativamente la condición de los pacientes con cáncer pancreático debido a la quimiorresistencia preexistente o adquirida de la mayoría de las células tumorales al fármaco (Oncogene 2003 22 de mayo; 22(21): 3243-51). Otro problema observado o prevalente en el tratamiento de cáncer es la toxicidad grave asociada con la mayoría de los agentes antineoplásicos. La incidencia de efectos secundarios graves tales como toxicidad cardíaca en casos de fármacos como doxorubicina se ha indicado en J Egypt Natl Cane Inst dic 2005\_17(4)\_291-300. A pesar de la incidencia de resistencia y toxicidad grave asociada con los agentes antineoplásicos convencionales por ejemplo gemcitabina, paclitaxel, estos agentes continuarán siendo importantes en tratamiento del cáncer porque tienen la capacidad de reducir la masa tumoral. Para mejorar la tasa de respuesta y evitar la toxicidad asociada con los agentes antineoplásicos convencionales, se están evaluando nuevos enfoques terapéuticos. Un enfoque tal se refiere a un protocolo que implica combinar diferentes agentes antineoplásicos que tienen diferente mecanismo biológico (Jekunen *et al.*, Br. J. Cancer, 69, 299-306 (1994); Yeh *et al.*, Life Sciences, 54, 431-35 (1994)). Un protocolo de quimioterapia de combinación óptimo puede dar como resultado aumento de la eficacia terapéutica, reducción de la toxicidad para el hospedador y resistencia a fármaco mínima o retardada. Cuando se combinan fármacos con diferentes toxicidades, cada fármaco puede usarse en su dosis óptima, ayudando a minimizar los efectos secundarios intolerables, como se ha notificado para la combinación de capecitabina y docetaxel en Oncology (Williston Park). oct 2002; 16: 17-22. Se ha descubierto que algunos de los agentes antineoplásicos son más eficaces sinérgicamente cuando se usan en combinación con otros agentes antineoplásicos que cuando se usan como una monoterapia. Por ejemplo, ciclofosfamida y 5-fluorouracilo actúan de forma sinérgica en células de adenocarcinoma de células claras ováricas como se indica en Cancer Lett. Ene 2001 10; 162(1): 39-48. También puede usarse de forma ventajosa quimioterapia de combinación para tratar cánceres en etapas avanzadas que son difíciles de tratar con monoterapia, radiación o tratamiento quirúrgico, por ejemplo, se ha indicado una combinación de paclitaxel y gemcitabina para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico (Cancer, 1 de sep 2006; 107(5): 1050-4).

**[0003]** Recientemente, se ha probado la combinación de uno o más agentes antineoplásicos convencionales tales

como paclitaxel, cisplatino, etc. con un agente antineoplásico molecularmente dirigido para el tratamiento de cáncer para mejorar las tasas de respuesta a fármaco y para abordar la resistencia a los agentes antineoplásicos. Los agentes molecularmente dirigidos por ejemplos mesilato de imatinib, flavopiridol, etc. modulan las proteínas tales como quinasas cuyas actividades están más específicamente asociadas con células cancerosas. Investigaciones durante un periodo largo de tiempo han demostrado que los miembros de la familia de quinasa dependiente de ciclina (CDK) desempeñan papeles clave en diversos procesos celulares. Se conocen 11 miembros de la familia CDK hasta ahora. Entre estos, se sabe que CDK1, 2, 3, 4 y 6 desempeñan papeles importantes en el ciclo celular (Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. Adv Cancer Res. 1995; 66: 181-212). Las CDK se activan formando complejos no covalentes con ciclinas tales como ciclinas de tipo A-, B-, C-, D- (D1, D2 y D3), y E-. Cada isozima de esta familia es responsable de aspectos particulares (señalización celular, transcripción, etc.) del ciclo celular y algunas de las isozimas de CDK son específicas para ciertos tipos de tejidos. Hay pruebas de expresión aberrante y sobreexpresión de estas quinasas en muchas afecciones. Se han desarrollado y presentado en la bibliografía varios compuestos que tienen propiedades inhibitoras de CDK potencialmente útiles. El flavopiridol es el primer inhibidor potente de quinasas dependientes de ciclina (CDK) que alcanza la etapa de ensayos clínicos. Se ha descubierto que flavopiridol potencia de forma sinérgica la respuesta citotóxica de los agentes antineoplásicos convencionales en una diversidad de líneas celulares cancerosas. Por ejemplo, el tratamiento secuencial de cáncer de colon HCT116 con docetaxel, flavopiridol y 5-fluorouracilo se ha presentado en Acta Pharmacol Sin. Oct 2006; 27(10): 1375-81. Además, se ha presentado tratamiento de flavopiridol y docetaxel combinado para células de cáncer de pulmón en Radiother Oncol. Mayo 2004; 71 (2): 213-21 y para tratamiento de cáncer gástrico en Mol Cancer Ther. Jun 2003; 2(6): 549-55.

**[0004]** Aunque se ha demostrado que combinaciones de agentes antineoplásicos tienen un avance significativo en protocolos de tratamiento de cáncer, aún hay varias necesidades no satisfechas y espacio para mejoras para las medicaciones para el tratamiento de cánceres, que son difíciles de tratar, o que han mostrado resistencia a tratamiento con los agentes antineoplásicos convencionales como una monoterapia. Más particularmente, el desarrollo de nuevo enfoque de combinación para suministrar agentes antineoplásicos conocidos que tienen diferente mecanismo de acción representaría un avance importante en la técnica. Aunque el protocolo que implica la combinación de agentes antineoplásicos que tienen diferentes mecanismos de acción puede funcionar en el caso de algunas combinaciones, puede no funcionar de la misma manera para otra combinación de agentes antineoplásicos y dicha combinación puede no siempre dar como resultado una combinación que tenga efectos terapéuticos ventajosos. Sin embargo, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una combinación farmacéutica nueva de agentes antineoplásicos conocidos que comprenden un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina seleccionado de compuestos representados por fórmula I (como se describe en el presente documento) y un agente antineoplásico citotóxico convencional para el tratamiento de diferentes cánceres proporciona una eficacia inesperadamente mayor que cuando se usan los agentes antineoplásicos solos.

#### Sumario de la invención:

**[0005]** En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un agente antineoplásico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; y un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionada de los compuestos de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos. La combinación muestra efecto sinérgico en el tratamiento de cánceres.

**[0006]** En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un agente antineoplásico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionada de los compuestos de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, para administración simultánea o secuencial para el tratamiento de cáncer.

**[0007]** En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a la combinación farmacéutica del primer o segundo aspecto para su uso en el tratamiento de cáncer y para su uso en la inducción de apoptosis celular.

**[0008]** En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a la combinación de un agente antineoplásico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionada de los compuestos de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, para su uso en el tratamiento de cáncer.

**[0009]** En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso de una combinación del primer o segundo aspecto para la preparación de un medicamento para tratar cáncer.

**[0010]** Otros aspectos y alcance adicional de la aplicabilidad de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación.

**Breve descripción de los dibujos:****[0011]**

La **Figura 1** ilustra que la combinación de doxorubicina y el compuesto A en el tratamiento de células de pulmón de células no pequeñas H-460 *in vitro* muestra sinergia. Las gráficas A, B, C y D representan la distribución del ciclo celular de diferentes grupos de tratamiento concretamente el control (durante 96 horas), doxorubicina 200 nM sola (durante 24 horas), el compuesto A 800 nM solo (durante 72 horas) y la combinación que comprende administración de doxorubicina 200 nM (durante 24 horas) seguido de compuesto A 800 nM (72 horas) respectivamente.

La **Figura 2** ilustra que la combinación de doxorubicina y el compuesto A en el tratamiento de células de pulmón de células no pequeñas H-460 *in vitro* muestra sinergia. Las gráficas A, B, C y D representan la distribución del ciclo celular de diferentes grupos de tratamiento concretamente el control (durante 120 horas), doxorubicina 100 nM sola (durante 24 horas), compuesto A 1200 nM solo (durante 96 horas) y la combinación que comprende administración de doxorubicina 100 nM (24 horas) seguido de compuesto A 1200 nM (96 horas) respectivamente.

La **Figura 3** demuestra que el uso de la combinación de gemcitabina y el compuesto A en el tratamiento de células pancreáticas (Panc-1) *in vitro* dio como resultado actividad sinérgica. Las gráficas A, B, C, D y E muestran distribución del ciclo celular de diferentes grupos de tratamiento concretamente el control (durante 24 horas), el control (durante 96 horas), gemcitabina 70 nM solo (durante 24 horas), compuesto A 300 nM solo (durante 72 horas) y la combinación que comprende administración de gemcitabina 70 nM (24 horas) seguido de compuesto A 300 nM (72 horas) respectivamente.

La **Figura 4** demuestra la detección de una apoptosis temprana en la combinación sinérgica de doxorubicina seguido de compuesto A después de 120 horas de tratamiento usando tinción con Anexina V. Las gráficas A, B, C y D muestran la distribución de células en cuatro cuadrantes en diferentes grupos de tratamiento concretamente el control (durante 120 horas), compuesto A 1200 nM solo (durante 96 horas), doxorubicina 100 nM sola (durante 24 horas) y la combinación que comprende administración de doxorubicina 100 nM (24 horas) seguido de compuesto A 1200 nM (96 horas) respectivamente.

La **Figura 5** ilustra que la combinación de doxorubicina y el compuesto A en el tratamiento de células de pulmón de células no pequeñas H-460 *in vitro* muestra sinergia cuando se ensaya en ensayo clonogénico.

La **Figura 6** muestra análisis de transferencia de western de diversas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y apoptosis.

La **Figura 7a** ilustra eficacia *in vivo* de doxorubicina (2 mpk) de células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460) y combinación del compuesto A (20 mpk) en modelo de xenotrasplante de H-460.

La **Figura 7b** ilustra la eficacia *in vivo* de combinación de doxorubicina (2 mpk) y compuesto A (35 mpk) en modelo de xenotrasplante H-460.

Las **Figuras 8a y 8b** muestran el peso tumoral medio al final del tratamiento y ET (barras) de 8 tumores de ratones individuales en cada grupo al final del estudio. El porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) al final del tratamiento se representa para el grupo respectivo en la parte superior de cada barra. Se usaron ensayos de t para muestras relacionadas para evaluar la significación estadística de la diferencia entre diferentes grupos de tratamiento. Se consideró que estaba presente una diferencia estadísticamente significativa a  $P < 0,05$ .

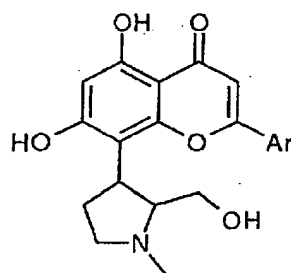
La **Figura 9** muestra transferencia de western usando anticuerpo COX-2.

**Descripción detallada de la invención:**

**[0012]** Se ha descubierto ahora que la combinación de la presente invención, que comprende un agente antineoplásico citotóxico convencional seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; muestra efecto sinérgico cuando se usa en el tratamiento de cáncer, particularmente tumores sólidos.

**[0013]** El inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención se selecciona de los compuestos de fórmula I como se describe en el presente documento posteriormente. Los inhibidores de CDK representados por la siguiente fórmula I se desvelan en la Publicación de Patente de PCT N° WO2004004632. Los compuestos de fórmula I son inhibidores de CDK prometedores, que pueden inhibir la proliferación de muchas células cancerosas. Los compuestos de fórmula I como se usan en la presente invención son eficaces contra diversos tumores malignos sólidos y hematológicos. Los inventores de la presente invención observaron que la combinación de inhibidores de CDK de fórmula I con un agente antineoplásico citotóxico convencional seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina dio como resultado un aumento de la apoptosis, o muerte celular programada.

**[0014]** Los inhibidores de CDK usados en la presente invención se seleccionan de los compuestos representados por la siguiente fórmula I,



Fórmula I

en la que Ar es un grupo fenilo, que está sustituido o no sustituido por 1, 2, ó 3 sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados de: halógeno tal como cloro, bromo, flúor o yodo, nitro, ciano, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo, trifluorometilo, hidroxilo, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alcoxi, carboxi, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alcoxycarbonilo, CONH<sub>2</sub>, y NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>; en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan cada uno de forma independiente de hidrógeno o C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo.

**[0015]** La preparación de los compuestos de fórmula I, que pueden estar en forma de sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, y la preparación de la composición farmacéutica oral y/o parenteral que contienen los compuestos anteriores se describe en la Publicación de Patente de PCT N° WO2004004632. Esta patente, que se incorpora en el presente documento por referencia, describe que los inhibidores de CDK representados por la fórmula I muestran eficacia antineoplásica significativa.

**[0016]** Como se ha indicado anteriormente en el presente documento los inhibidores de CDK de fórmula I pueden usarse en la forma de sus sales o solvatos. Las sales preferidas de compuestos de fórmula I incluyen sal de clorhidrato, sal de ácido metanosulfónico y sal de ácido trifluoroacético.

**[0017]** Se apreciará por los expertos en la materia que los compuestos de fórmula I contienen al menos dos centros quirales. Los compuestos de fórmula I existen por lo tanto en forma de dos isómeros ópticos diferentes (es decir enantiómeros (+) o (-)). Todos los enantiómeros tales y mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas, están incluidos dentro del alcance de la invención. Los enantiómeros del compuesto de fórmula I pueden obtenerse por procedimientos descritos en el documento WO2004/004632 y WO2007/148158 cuyas solicitudes de patente se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades. Los enantiómeros del compuesto de fórmula I también pueden obtenerse por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como HPLC quiral y resolución enzimática. Como alternativa, los enantiómeros de los compuestos de fórmula (I) pueden sintetizarse usando materiales de partida ópticamente activos. Por lo tanto, la definición del inhibidor de CDK de fórmula I incluye todos los posibles estereoisómeros y sus mezclas. La definición de fórmula I incluye las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados que tienen la actividad especificada.

**[0018]** El agente o agentes antineoplásicos citotóxicos convencionales usados en la combinación farmacéutica de la presente invención pueden seleccionarse del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina, gemcitabina y agentes antineoplásicos citotóxicos análogos que muestran la actividad antineoplásica a través de un mecanismo de acción similar.

**[0019]** El paclitaxel es un producto de diterpeno natural aislado del tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* (Rowinsky *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 82, 1247-1259 (1990)). El aislamiento del paclitaxel y su estructura se describe en J. Am. Chem. Soc. 93, 2325 (1971). Es un agente antimicrobular que promueve el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos evitando la despolimerización. El paclitaxel se ha aprobado para su uso clínico en el tratamiento de cáncer de ovario (Merkman *et al.*; Yale Journal Of Biology and Medicine, 64: 583,1991) y para el tratamiento de cáncer de mama (Holmes *et al.*; J. Nat. cancer Inst, 83; 1797,1991), sin embargo, también es útil en el tratamiento de otros cánceres, por ejemplo, se ha considerado como un candidato potencial para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello (Forastire *et al.*, Sem. Oncol., 20: 56, 1990) y cáncer de pulmón (M. Ghaemmghami *et al.*; Chest; 113; 86-91 (1998)). Paclitaxel se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.670.537 que se incorpora en el presente documento por referencia por su enseñanza sobre el uso o administración de paclitaxel en el tratamiento de cánceres susceptibles. El paclitaxel está disponible en el mercado como una solución inyectable, Taxol®. El uso de paclitaxel como monoterapia generalmente está acompañado por efectos secundarios no deseables, incluyendo reacciones de hipersensibilidad, hipotensión, bradicardia, hipertensión, náuseas y vómitos y reacciones en el sitio de inyección.

**[0020]** Docetaxel pertenece a la familia de los taxanos y es un derivado semisintético de paclitaxel. El docetaxel está indicado principalmente para cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas. También es útil en el tratamiento de otros cánceres. Este compuesto se describe en el documento U. S. 4.814.470, que se incorpora en el presente documento por referencia por su enseñanza de la síntesis y uso de docetaxel para tratar cánceres susceptibles. El trihidrato de docetaxel está disponible en el mercado como una solución inyectable, Taxotere®. Todos los tratamientos basados en derivados de taxoides, incluyendo docetaxel, pueden mostrar toxicidades graves

y preocupantes, tales como mielosupresión, neutropenia, hipersensibilidad, neuropatía periférica y retención de fluidos, entre otras (Fumoleau *et al.*, Bull. Cancer, (82)8: 629-636 (1995)).

**[0021]** Doxorrubicina es el nombre genérico de Adriamycin® y está disponible en el mercado en una forma inyectable. La doxorrubicina se aisló en primer lugar del caldo de fermentación de *Streptomyces peucetius var caesius* (Patente de Estados Unidos N° 3.590.028). Este agente antineoplásico citotóxico se une a ácidos nucleicos, supuestamente por intercalación específica del núcleo de antraciclina planar en la doble hélice de ADN, dando como resultado replicación celular anómala. La doxorrubicina se usa en el tratamiento de cánceres de mama, vejiga, hígado, pulmón, próstata, estómago y tiroides; sarcomas de tejido blando y hueso; linfomas y leucemias; y tumores de la infancia. El uso de doxorrubicina está acompañado generalmente de varios efectos secundarios incluyendo mielosupresión, náuseas y vómitos, efectos mucocutáneos y cardíacos.

**[0022]** La gemcitabina es el nombre genérico asignado a 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina. Está disponible en el mercado como la sal de monoclóhidrato y como el isómero β. La gemcitabina se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.808.614 y 5.464.826, que se incorporan en el presente documento por referencia por su enseñanza de cómo sintetizar y usar gemcitabina para tratar cánceres susceptibles. La formulación comercial de clorhidrato de gemcitabina como un agente sencillo se indica como tratamiento de primera línea para pacientes con adenocarcinoma metastásico o localmente avanzado del carcinoma de células pulmonares (NSCLC) o de páncreas y se usa habitualmente en pacientes tratados previamente con 5-fluorouracilo.

**[0023]** Los términos generales usados en el presente documento anteriormente y en lo sucesivo en el presente documento preferiblemente tienen dentro del contexto de la presente memoria descriptiva los siguientes significados, a no ser que se indique de otro modo:

Las formas singulares “un” y “el” incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

**[0024]** La expresión “un agente antineoplásico” es sinónima de “un agente quimioterapéutico” o “un agente anticanceroso” y se refiere a un agente terapéutico, que actúa inhibiendo o evitando el crecimiento de neoplasmas. La expresión “un agente antineoplásico” o “un agente anticanceroso” en general se refiere a compuestos que evitan que las células cancerosas se multipliquen (es decir agentes antiproliferativos). En general, el agente o agentes antineoplásicos quedan en dos clases, citotóxicos antiproliferativos y citostáticos antiproliferativos. Los agentes citotóxicos evitan que las células cancerosas se multipliquen: (1) interfiriendo con la capacidad de la célula para replicar ADN y (2) induciendo la muerte celular y/o apoptosis en las células cancerosas. Los agentes citostáticos antiproliferativos actúan mediante modulación, interferencia o inhibición de los procesos de transducción de señales celulares que regulan la proliferación celular. En la presente invención los agentes antineoplásicos comprendidos en la combinación farmacéutica de la presente invención son los agentes citotóxicos y por lo tanto se denominan agentes antineoplásicos citotóxicos.

**[0025]** Como se usa en el presente documento, el término “sinérgico” significa que el efecto conseguido con los métodos y combinaciones de la presente invención es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar el agente o agentes antineoplásicos citotóxicos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, e inhibidor de CDK de fórmula I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, de forma separada. Provechosamente, dicha sinergia proporciona mayor eficacia a las mismas dosis y/o evita o retarda la acumulación de resistencia a multifármacos.

**[0026]** Como se usa en el presente documento la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de agente quimioterapéutico, que proporciona la máxima apoptosis de células proliferativas a la menor toxicidad para células no proliferativas.

**[0027]** El término “apoptosis” se refiere a un tipo de muerte celular en el que una serie de etapas moleculares en una célula conduce a su muerte. Esta es la forma normal del cuerpo de deshacerse de células anómalas o innecesarias. El proceso de apoptosis puede bloquearse en las células cancerosas. También se llama muerte celular programada (Dictionary of cancer terms. National Cancer institute).

**[0028]** Como se usa en el presente documento la expresión “aumento de la apoptosis” se define como un aumento de la tasa de muerte celular programada, es decir se induce que más células entren en el proceso de muerte en comparación con exposición (contacto) con el agente antineoplásico citotóxico solo o el inhibidor de CDK solo.

**[0029]** El término “sujeto” como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que ha sido el objeto de tratamiento, observación o experimento.

**[0030]** En una realización, la presente invención se refiere a una nueva combinación farmacéutica para el tratamiento de cáncer en la que dicha combinación comprende un agente antineoplásico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorrubicina o gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un inhibidor de quinasas dependiente de ciclina (CDK) seleccionado de los compuestos de fórmula

I (como se describe en el presente documento) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

**[0031]** En una realización, la combinación farmacéutica que comprende el inhibidor de CDK de fórmula I y los agentes antineoplásicos citotóxicos como se describen en el presente documento, no se limitan exclusivamente a las combinaciones que se obtienen por asociación física de dichos ingredientes, sino que también abarcan los que permiten una administración separada, que puede ser simultánea, secuencial o espaciada durante un periodo de tiempo para obtener la máxima eficacia de la combinación. Por lo tanto, la combinación farmacéutica puede administrarse de forma simultánea o espaciarse durante un periodo de tiempo para un tratamiento de cáncer eficaz.

**[0032]** Para el fin de la presente invención, el inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I puede administrarse, por ejemplo, antes de, después de o simultáneo con el agente antineoplásico citotóxico. En una realización preferida de la presente invención, el agente antineoplásico citotóxico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra antes de la administración del inhibidor de CDK de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el intervalo de dosificación descrito posteriormente. Sin embargo, el método y secuencia óptimos para administración del inhibidor de CDK y el agente antineoplásico citotóxico en condiciones dadas puede seleccionarse de forma adecuada por los expertos en la materia siguiendo técnicas rutinarias y la información contenida en la presente memoria descriptiva.

**[0033]** En una realización, los constituyentes comprendidos en la combinación pueden tener que administrarse por diferentes vías, debido a sus características físicas y químicas diferentes. Por ejemplo, los inhibidores de CDK de fórmula I pueden administrarse por vía oral o vía parenteral para generar y mantener buenos niveles en sangre de los mismos, mientras que el agente o agentes antineoplásicos citotóxicos pueden administrarse por vía parenteral, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

**[0034]** Para su uso oral, los inhibidores de CDK de fórmula 1 pueden administrarse, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables, u obleas, o como soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar y se añaden habitualmente agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Para administración oral en forma de cápsula, los vehículos útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar.

**[0035]** Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, se emplean habitualmente soluciones estériles del principio activo (el agente o agentes antineoplásicos citotóxicos o el inhibidor de CDK), y el pH de las soluciones debería ajustarse y tamponarse de forma adecuada.

**[0036]** También se describe en el presente documento un método para el tratamiento de cáncer, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación. En consecuencia, en el método, el cáncer se trata en un sujeto administrando al sujeto una cantidad terapéutica de un agente antineoplásico citotóxico eficaz para tratar el cáncer, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, en el que resulta un efecto sinérgico.

**[0037]** Como se indica en el presente documento, los principios activos contenidos en la composición farmacéutica pueden administrarse de forma simultánea o secuencial.

**[0038]** Por lo tanto, el método de tratamiento de cáncer puede comprender administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéutica del agente antineoplásico citotóxico simultáneamente con una cantidad terapéutica del inhibidor de CDK representado por los compuestos de fórmula I.

**[0039]** El método de tratamiento de cáncer puede implicar administración secuencial de una cantidad terapéutica del agente antineoplásico citotóxico y una cantidad terapéutica del inhibidor de CDK representado por los compuestos de fórmula I, a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

**[0040]** El método de tratamiento de cáncer puede implicar administración a un sujeto que necesite dicho tratamiento de una cantidad terapéutica del agente antineoplásico citotóxico antes de administración del inhibidor de CDK representado por los compuestos de fórmula I.

**[0041]** La combinación farmacéutica de la presente invención puede usarse en el tratamiento de cáncer seleccionado del grupo que comprende cáncer de mama, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), cáncer ovárico, cáncer pancreático (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), cáncer gástrico, cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.

**[0042]** En una realización preferida, la combinación farmacéutica de la presente invención puede usarse en el tratamiento de cáncer seleccionado de cáncer pancreático y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

**[0043]** La dosificación real de los principios activos contenidos en la combinación puede variarse dependiendo de

los requisitos del paciente y la gravedad de la afección que se trata. La determinación de la dosificación apropiada para una situación particular está dentro de la experiencia de la técnica. Generalmente, se inicia tratamiento con dosis más pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. A continuación, la dosis de cada ingrediente se aumenta en cantidades pequeñas hasta que se alcanza el efecto óptimo según las circunstancias. Sin embargo, la cantidad de cada ingrediente en la combinación farmacéutica típicamente será menor que una cantidad que produciría un efecto terapéutico si se administrara sola. Por conveniencia, la dosis diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día si se desea. En una realización preferida, el agente antineoplásico citotóxico o un sal farmacéuticamente aceptable del mismo, e inhibidor de CDK representado por los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos se administra secuencialmente de formas inyectables, de modo que el agente antineoplásico citotóxico se administra en una dosis sinérgicamente eficaz que varía de 10 mg a 1400 mg, preferiblemente que varía de 15 mg a 1000 mg y el inhibidor de CDK se administra en una dosis sinérgicamente eficaz que varía de 5 mg a 750 mg, preferiblemente que varía de 10 mg a 300 mg.

**[0044]** En una realización preferida de la invención, cuando el agente antineoplásico citotóxico es paclitaxel, este se administra en una dosis sinérgicamente eficaz que varía de 30 mg a 300 mg.

**[0045]** En otra realización preferida más de la invención, cuando el agente antineoplásico citotóxico es docetaxel, se administra en una dosis sinérgicamente eficaz que varía de 20 mg a 175 mg.

**[0046]** En otra realización preferida más de la invención, cuando el agente antineoplásico citotóxico es doxorubicina, se administra en una dosis sinérgicamente eficaz que varía de 17,5 mg a 75 mg.

**[0047]** En otra realización preferida más de la invención, cuando el agente antineoplásico citotóxico es gemcitabina, este se administra en una dosis sinérgicamente eficaz que varía de 70 mg a 1200 mg.

**[0048]** Las combinaciones proporcionadas por la presente invención se han evaluado en ciertos sistemas de ensayo y en varios programas de administración diferentes *in vitro*. Los detalles experimentales son como se proporcionan en el presente documento posteriormente. Los datos presentados en el presente documento claramente indican que el agente antineoplásico citotóxico cuando se combina con un inhibidor de CDK de fórmula I muestra efecto sinérgico. Se indica claramente que los agentes anticancerosos cuando se usan en combinación en el tratamiento de cáncer aumentan la apoptosis o citotoxicidad en células proliferativas en comparación con cuando las células se tratan solamente con el inhibidor de CDK de fórmula I o el agente antineoplásico citotóxico solo. Por ejemplo, puede observarse claramente a partir de los datos proporcionados en las Tablas 2-4 que el inhibidor de CDK, un compuesto representativo de fórmula I designado en el presente documento como el compuesto A, potenció sinérgicamente la citotoxicidad de doxorubicina en un análisis *in vitro* frente a células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

**[0049]** El compuesto representativo, el compuesto A usado en los ensayos farmacológicos se refiere a clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona y fue uno de los compuestos descritos en la solicitud de patente de PCT publicada WO2004004632, incorporada en el presente documento por referencia.

**[0050]** Los inventores también establecieron modelos de xenotrasplante para extender observaciones *in vitro* a un sistema *in vivo*. Los inventores ensayaron la combinación de la presente invención con respecto a su eficacia *in vivo* usando modelos de xenotrasplante de pulmón de células no pequeñas de ratones macho SCID (Inmunodeficientes Combinados Graves). Se observó que el inhibidor de CDK potenciaba sinérgicamente la eficacia de la doxorubicina cuando se administraba en combinación secuencial con doxorubicina. Resulta evidente a partir de la presentación gráfica de las Figuras 7a y 7b que la combinación farmacéutica de la presente invención mostró actividad terapéuticamente sinérgica en modelos de xenotrasplante de pulmón de células no pequeñas de ratones SCID.

**[0051]** En un estudio *in vitro* paralelo realizado por los presentes inventores que implicaba el uso de una combinación que comprende un agente antineoplásico citotóxico convencional, doxorubicina y otro inhibidor de CDK conocido, flavopiridol en el tratamiento de líneas celulares H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano, se descubrió que la combinación de doxorubicina y flavopiridol independientemente de la secuencia de administración daba como resultado un efecto aditivo y no se mostró sinergia (Tabla 16 – A, B, C). Los detalles de este estudio se demuestran en el presente documento posteriormente. Por lo tanto, no puede predecirse con certeza que una combinación de agentes antineoplásicos que tengan diferentes mecanismos de acción, pueda dar como resultado siempre efectos terapéuticos ventajosos. Sin embargo, los inventores han demostrado claramente la eficacia sinérgica de la nueva combinación farmacéutica de la presente invención.

**[0052]** El efecto sinérgico de la combinación de la presente invención que comprende un agente antineoplásico citotóxico y un inhibidor de CDK se explica ahora en más detalle con referencia a realizaciones preferidas de la misma. Debe observarse que estas se proporcionan solamente como ejemplos y no se pretende que limiten la invención.

**Ensayos Farmacológicos:****Ensayo de citotoxicidad *in vitro*:**

**[0053]** El ensayo de citotoxicidad usado fue ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna). Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo en 180  $\mu$ l de medio de cultivo en placa de 96 pocillos y se incubaron durante una noche para permitir que las células se adhirieran. Se añadieron diversas concentraciones de los fármacos contenidos en la combinación a los pocillos y se incubaron durante un periodo de tiempo apropiado en incubador de CO<sub>2</sub> 5% modificado a 37 °C en caso de una exposición a fármaco sencillo. Cuando se trató con dos fármacos el agente antineoplásico citotóxico convencional (paclitaxel, docetaxel y doxorubicina) se administró durante 3 horas o 24 horas seguido de retirada del medio y lavado de las células una vez con el medio. Después de lavar las células, se añadieron dos concentraciones diferentes de compuesto A a los pocillos y las placas se incubaron durante 48, 72 ó 96 horas en incubador de CO<sub>2</sub> 5% humidificado a 37 °C. Los pocillos de control se trataron con un vehículo. Al final del periodo de incubación, el medio se retiró de los pocillos y se añadieron 20  $\mu$ l de MTS (2 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 6-6,5 y esterilizado por filtración) y 1  $\mu$ l de metosulfato de fenacina (PMS, 3 mM en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,3 y esterilizado por filtración) a cada pocillo y el volumen total se ajustó a 200  $\mu$ l con medio completo. La placa se incubó durante 2-4 horas en incubador de CO<sub>2</sub> 5% humidificado a 37 °C. La placa se leyó a 490 nm en un Espectrofotómetro (SpectraMax, Molecular Devices); el porcentaje de citotoxicidad y CI<sub>50</sub> se calculó usando SoftMax, software para SpectraMax.

**Ejemplo 1:**

**[0054]** Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de doxorubicina y compuesto A en el que doxorubicina y el compuesto A se administraron secuencialmente de modo que se administró doxorubicina antes que el compuesto A. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorubicina o el compuesto A solo. El tratamiento de doxorubicina fue durante las primeras 24 horas, seguido de medio completo durante 72 horas mientras que en el caso del compuesto A, las primeras 24 horas fue en medio completo seguido por el compuesto A durante las siguientes 72 horas. Las concentraciones de doxorubicina usadas fueron 100 nM y 200 nM mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 800 nM (concentración CI<sub>30</sub> después de tratamiento de 48 horas). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con doxorubicina 200 nM o 100 nM durante las primeras 24 horas seguido de 800 nM del compuesto A durante 72 horas. Después de la compleción del tratamiento de fármacos es decir al final de 96 horas las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestran en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1**

| Tratamiento Farmacológico                                                     | Concentración de Doxorubicina (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| Doxorubicina                                                                  | 200                                | 0                                                    | 19                 |
|                                                                               | 100                                | 0                                                    | 16                 |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                                | 0                                  | 800                                                  | 17                 |
| Doxorubicina (24 horas) seguido del inhibidor de CDK (compuesto A) (72 horas) | 200                                | 800                                                  | 53                 |
|                                                                               | 100                                | 800                                                  | 46                 |

**Ejemplo 2:**

**[0055]** Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de doxorubicina y compuesto A en el que se administraron doxorubicina y el compuesto A secuencialmente de modo que se administró doxorubicina antes que el compuesto A. En este ejemplo el compuesto A se usó a una concentración de 1200 nM. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorubicina o el compuesto A solo. El tratamiento de doxorubicina fue durante las primeras 24 horas seguido de medio completo durante 72 horas mientras que en el caso del compuesto A, las primeras 24 horas fue en medio completo seguido del compuesto A durante las siguientes 72 horas. Las concentraciones de doxorubicina usadas fueron 200 nM y 100 nM, mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 1200 nM (concentración CI<sub>50</sub> después de 48 horas de tratamiento). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con doxorubicina 100 nM o 200 nM durante 24 horas seguido de compuesto A 1200 nM durante 72 horas. Después de la compleción del tratamiento de fármacos es decir al final de las 96 horas las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el

porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestra en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

| Tratamiento Farmacológico                                                      | Concentración de Doxorrubicina (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| Doxorrubicina                                                                  | 200                                 | 0                                                    | 19                 |
|                                                                                | 100                                 | 0                                                    | 16                 |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                                 | 0                                   | 1200                                                 | 36                 |
| Doxorrubicina (24 horas) seguido del inhibidor de CDK (compuesto A) (72 horas) | 200                                 | 1200                                                 | 70                 |
|                                                                                | 100                                 | 1200                                                 | 67                 |

5

**Ejemplo 3:**

**[0056]** Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de doxorrubicina y compuesto A en el que se administró doxorrubicina y el compuesto A de forma secuencial de modo que se administró doxorrubicina antes que el compuesto A. En este ejemplo el compuesto A se usó a una concentración de 1200 nM y el periodo de tiempo espaciado fue de 96 horas. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorrubicina o el compuesto A solo. El tratamiento de doxorrubicina fue durante las primeras 24 horas seguido de medio completo durante 96 horas mientras que en el caso del compuesto A, las primeras 24 horas fueron en medio completo seguido del compuesto A durante las siguientes 96 horas. Las concentraciones de doxorrubicina usadas fueron 100 nM y 200 nM, mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 1200 nM (concentración de  $Cl_{50}$  después de 48 horas de tratamiento). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con doxorrubicina 100 nM o 200 nM durante 24 horas seguido de 1200 nM del compuesto A durante 96 horas. Después de la compleción del tratamiento de fármacos es decir al final de 120 horas las placas se procesaron con respecto a ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestran en la siguiente Tabla 3.

10

15

20

Tabla 3

| Tratamiento Farmacológico                                                      | Concentración de Doxorrubicina (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| Doxorrubicina                                                                  | 200                                 | 0                                                    | 17                 |
|                                                                                | 100                                 | 0                                                    | 8                  |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                                 | 0                                   | 1200                                                 | 32                 |
| Doxorrubicina (24 horas) seguido del inhibidor de CDK (compuesto A) (96 horas) | 200                                 | 1200                                                 | 73                 |
|                                                                                | 100                                 | 1200                                                 | 69                 |

**Ejemplo 4:**

**[0057]** Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de doxorrubicina y compuesto A administrado simultáneamente durante 120 horas. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorrubicina o el compuesto A solo durante 120 horas cada uno. Las concentraciones de doxorrubicina usadas fueron 30 nM y 100 nM, mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 800 nM y 1200 nM (concentración de  $\sim Cl_{30}$  y  $\sim Cl_{50}$  después de 48 horas de tratamiento). En este estudio de combinación, se añadieron doxorrubicina 30 nM o 100 nM y compuesto A 1200 nM u 800 nM juntos durante 120 horas. Después de la compleción del tratamiento de fármacos es decir al final de 120 horas las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestra en la siguiente Tabla 4.

30

35

Tabla 4

| Tratamiento Farmacológico                                              | Concentración de Doxorubicina (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| Doxorubicina                                                           | 100                                | 0                                                    | 19                 |
|                                                                        | 30                                 | 0                                                    | 3                  |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                         | 0                                  | 1200                                                 | 44                 |
|                                                                        | 0                                  | 800                                                  | 24                 |
| Doxorubicina e inhibidor de CDK (compuesto A) juntos durante 120 horas | 100                                | 800                                                  | 61                 |
|                                                                        | 30                                 | 1200                                                 | 60                 |

**Ejemplo 5:**

- 5 **[0058]** Este Ejemplo muestra que no hay efecto sinérgico cuando se administró el compuesto A antes que el agente antineoplásico citotóxico, doxorubicina. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorubicina o el compuesto A solo. El tratamiento de compuesto A fue durante las primeras 24 horas seguido de medio completo durante 24 horas mientras que en el caso de doxorubicina, las primeras 96 horas fue en medio completo seguido de doxorubicina durante 24 horas. Las concentraciones de doxorubicina usadas fueron 30 nM, 70 nM, 100 nM y 200 nM, mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 800 nM y 1200 nM (concentración de  $\sim\text{CI}_{30}$  y  $\sim\text{CI}_{50}$  después de 48 horas de tratamiento). En este estudio de combinación, se añadió compuesto A 1200 nM u 800 nM durante las primeras 96 horas seguido de doxorubicina 30 nM, 70 nM, 100 nM o 200 nM durante 24 horas. Después de la compleción del tratamiento de fármacos, es decir al final de 120 horas, las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. La Tabla 6 indica que el porcentaje de citotoxicidad en esta combinación es menor que la citotoxicidad del compuesto A cuando se administra por sí solo. Por lo tanto este efecto de secuencia es antagonista, puesto que la doxorubicina no potencia el efecto del primer fármaco, que es el compuesto A en este caso. Los resultados son como se muestran en la siguiente Tabla 5.

20

Tabla 5

| Concentración de Doxorubicina (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad [inhibidor de CDK compuesto A (96 horas) seguido de Doxorubicina (24 horas)] |
|------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 200                                | 1200                                                 | 46                                                                                              |
|                                    | 800                                                  | 16                                                                                              |
| 100                                | 1200                                                 | 45.6                                                                                            |
|                                    | 800                                                  | 15                                                                                              |
| 70                                 | 1200                                                 | 42.3                                                                                            |
|                                    | 800                                                  | 14                                                                                              |
| 30                                 | 1200                                                 | 41                                                                                              |
|                                    | 800                                                  | 17.5                                                                                            |
| 0                                  | 1200                                                 | 52                                                                                              |
| 0                                  | 800                                                  | 19                                                                                              |

- 25 **[0059]** Los Ejemplos 1-4 muestran claramente que el inhibidor de CDK potencia de forma sinérgica el efecto de la doxorubicina cuando se administra inhibidor de CDK después o simultáneamente con el fármaco citotóxico. El Ejemplo 5 también muestra la importancia del tratamiento secuencial. Se haya que el tratamiento con doxorubicina seguido por el inhibidor de CDK es sinérgico mientras que la secuencia inversa no es eficaz.

**Ejemplo 6:**

- 30 **[0060]** Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de docetaxel y del compuesto A en el que

docetaxel y el compuesto A se administraron de forma secuencial de modo que se administró docetaxel antes que el compuesto A. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 3000 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con docetaxel o el compuesto A solo. El tratamiento con docetaxel fue durante las primeras 3 horas seguido de medio completo durante 45 horas mientras que en el caso del tratamiento con compuesto A, las primeras 3 horas fue en medio completo seguido del compuesto A durante las siguientes 45 horas. Las concentraciones de docetaxel usadas fueron 0,1 nM y 3 nM, mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 700 nM (concentración  $\sim$ CI<sub>30</sub> después de 48 horas de tratamiento). En este estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con docetaxel 0,1 nM o 3 nM durante 3 horas seguido de compuesto A 700 nM durante 45 horas. Después de la compleción del tratamiento con fármacos, es decir al final de 48 horas las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y se calculó el porcentaje de citotoxicidad en comparación con el control. Los resultados son como se muestra en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6

| Tratamiento Farmacológico                                                 | Concentración de Docetaxel (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| Docetaxel                                                                 | 3                               | 0                                                    | 2                  |
|                                                                           | 0,1                             | 0                                                    | 0                  |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                            | 0                               | 700                                                  | 13                 |
| Docetaxel (3 horas) seguido del inhibidor de CDK (compuesto A) (45 horas) | 3                               | 700                                                  | 33                 |
|                                                                           | 0,1                             | 700                                                  | 30                 |

## Ejemplo 7:

[0061] Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de docetaxel y del compuesto A en el que docetaxel y el compuesto A se administraron secuencialmente de modo que se administró docetaxel antes que el compuesto A. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 3000 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con docetaxel o el compuesto A solo. El tratamiento de docetaxel fue durante las primeras 3 horas seguido de medio completo durante 45 horas mientras que en el caso del tratamiento con compuesto A, las primeras 3 horas fue en medio completo seguido del compuesto A durante las siguientes 45 horas. Las concentraciones de docetaxel usadas fueron 0,1 nM y 3 nM, mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 1000 nM (concentración  $\sim$ CI<sub>50</sub> después de 48 horas de tratamiento). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con docetaxel 0,1 nM o 3 nM durante 3 horas seguido de compuesto A 1000 nM durante 45 horas. Las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestran en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7

| Tratamiento Farmacológico                                                 | Concentración de Docetaxel (nM) | Concentración de inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| Docetaxel                                                                 | 3                               | 0                                                    | 2                  |
|                                                                           | 0,1                             | 0                                                    | 0                  |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                            | 0                               | 1000                                                 | 35                 |
| Docetaxel (3 horas) seguido del inhibidor de CDK (compuesto A) (45 horas) | 3                               | 1000                                                 | 53                 |
|                                                                           | 0,1                             | 1000                                                 | 52                 |

## Ejemplo 8:

[0062] Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de paclitaxel y el compuesto A en el que paclitaxel y el compuesto A se administraron de forma secuencial de modo que se administró paclitaxel antes que el compuesto A. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con paclitaxel o el compuesto A solo. El tratamiento con paclitaxel fue durante las primeras 3 horas seguido de medio completo durante 45 horas mientras que en el caso del tratamiento con compuesto A, las primeras 3 horas fue en

medio completo seguido del compuesto A durante las siguientes 45 horas. Las concentraciones de paclitaxel usadas fueron 10 nM mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 700 nM (concentración  $\sim$ CI<sub>30</sub> después de 48 horas de tratamiento). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con paclitaxel 10 nM durante 3 horas seguido de compuesto A 700 nM durante 45 horas. Después de la compleción del tratamiento con fármacos, es decir al final de 48 horas las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestran en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8

| Tratamiento Farmacológico                                                 | Concentración de Paclitaxel (nM) | Concentración del inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|
| Paclitaxel                                                                | 10                               | 0                                                     | 10                 |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                            | 0                                | 700                                                   | 21                 |
| Paclitaxel (3 horas) seguido de inhibidor de CDK (compuesto A) (45 horas) | 10                               | 700                                                   | 41                 |

#### Ejemplo 9:

**[0063]** Este Ejemplo muestra el efecto sinérgico de la combinación de gemcitabina y el compuesto A en el que se administró gemcitabina y el compuesto A de forma secuencial de modo que se administró gemcitabina antes que el compuesto A. Las células de la línea celular pancreática humana (Panc-1) se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con gemcitabina o el compuesto A solo. El tratamiento con gemcitabina fue durante las primeras 24 horas seguido de medio completo durante 72 horas, mientras que en el caso de tratamiento con compuesto A, las primeras 24 horas fue en medio completo seguido del compuesto A durante las siguientes 72 horas. Se usó gemcitabina a una concentración de 70 nM mientras que el compuesto A se usó a una concentración de 300 nM (concentración  $\sim$ CI<sub>30</sub> después de 48 horas de tratamiento). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con gemcitabina 70 nM durante 24 horas seguido de compuesto A 300 nM durante 72 horas. Después de la compleción del tratamiento con fármacos, es decir al final de 96 horas las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestran en la siguiente Tabla 9.

Tabla 9

| Tratamiento Farmacológico                                                    | Concentración de gemcitabina (nM) | Concentración del inhibidor de CDK (Compuesto A) (nM) | % de Citotoxicidad |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|
| Gemcitabina                                                                  | 200                               | 0                                                     | 78                 |
|                                                                              | 100                               | 0                                                     | 38                 |
|                                                                              | 70                                | 0                                                     | 18                 |
|                                                                              | 30                                | 0                                                     | 2                  |
| Inhibidor de CDK (compuesto A)                                               | 0                                 | 300                                                   | 34                 |
| Gemcitabina (24 horas) seguido del inhibidor de CDK (compuesto A) (72 horas) | 200                               | 300                                                   | 97                 |
|                                                                              | 100                               | 300                                                   | 82                 |
|                                                                              | 70                                | 300                                                   | 74                 |
|                                                                              | 30                                | 300                                                   | 53                 |

#### Análisis de la distribución del ciclo celular y citometría de flujo:

**[0064]** Se sembraron H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano en matraces de cultivo tisular de 25 mm<sup>3</sup>. Después de 24 horas, las células se trataron con el compuesto A solo durante 72 horas o 96 horas y el agente antineoplásico citotóxico, doxorrubicina solo durante 24 horas. Para los estudios de combinación, las células se trataron primero con el agente antineoplásico citotóxico doxorrubicina durante 24 horas seguido del compuesto A durante 72 horas o 96 horas después de la retirada del agente antineoplásico citotóxico y lavado de las células dos veces con PBS. Las células de control se dejaron sin tratar durante 96 horas o 120 horas. Las células tanto separadas como adherentes se recogieron en diferentes puntos temporales. Las células se lavaron dos veces con aproximadamente 5 ml de PBS con centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células se

resuspendieron en 500 µl de PBS y se fijaron en 500 µl de etanol 70 % helado. Las células fijadas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Al sedimento celular se añadió 1 ml de etanol 70 % helado y el sedimento celular se mantuvo después en refrigeración hasta análisis posterior. Las células se lavaron dos veces con PBS para retirar fijador y se resuspendieron en 250 µl de PBS. A esto se añadieron 50 µl de yoduro de propidio (4 mg/ml en PBS) y 12,5 µl de Rnasa A (1 mg/ml). Después de incubación a 37 °C durante 30 minutos, las células se analizaron usando citometría de flujo.

**[0065]** Se usó un citómetro de flujo FACS Calibur de Becton Dickinson de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El láser iónico de argón ajustado a 488 nm se usó como una fuente de excitación. Se designó que las células con contenido de ADN entre 2n y 4n estaban en las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, como se define por el nivel de fluorescencia roja. Las células que mostraban contenido de ADN menor de 2n se designaron como células sub-G<sub>1</sub>. El número de células en cada compartimento de ciclo celular se expresó como un porcentaje del número total de células presentes.

#### **Ejemplo 10:**

**[0066]** Este Ejemplo proporciona la distribución del ciclo celular para los diversos tratamientos como se muestran en la figura 1. Se sembraron aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  células en un matraz de cultivo tisular para los grupos de tratamiento. El protocolo de ensayo fue como se ha mencionado anteriormente en "análisis de distribución de ciclo celular y citometría de flujo". El ciclo celular se dividió en cuatro partes, que se representan en la figura 1 como M1, M2, M3 y M4. M1 corresponde a la fase G<sub>1</sub>, M2 a la fase S, M3 a la fase G<sub>2</sub>-M y M4 a la fase sub G<sub>1</sub>, que representa las células que experimentan apoptosis. El control de 96 horas en el que no hubo tratamiento farmacológico mostró apoptosis insignificante de solamente 2 %, mientras que el grupo de tratamiento con solo uno de los fármacos mostró solamente 10 % de apoptosis para tanto el compuesto A como doxorubicina solos. La combinación de ambos fármacos mostró una apoptosis aumentada del 34 %.

#### **Ejemplo 11:**

**[0067]** Este Ejemplo proporciona la distribución del ciclo celular para los diversos grupos de tratamiento como se muestran en la figura 2. Se sembraron aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  células en un matraz de cultivo tisular para los grupos de tratamiento. El protocolo de ensayo fue como se ha mencionado anteriormente en "análisis de distribución de ciclo celular y citometría de flujo". El ciclo celular se dividió en cuatro partes, que se representan en la figura como M1, M2, M3 y M4. M1 corresponde a la fase G<sub>1</sub>, M2 a la fase S, M3 a la fase G<sub>2</sub>-M y M4 a la fase sub G<sub>1</sub>, que representa las células que experimentan apoptosis. El control de 120 horas en el que no hubo tratamiento farmacológico mostró apoptosis insignificante de solamente 8 %, mientras que el grupo de tratamiento con uno de los fármacos solo mostró 32 % y 3 % de apoptosis para el compuesto A y doxorubicina respectivamente. La combinación de ambos fármacos mostró una apoptosis aumentada del 65 %.

#### **Ejemplo 12:**

**[0068]** Este Ejemplo proporciona la distribución del ciclo celular para los diversos grupos de tratamiento como se muestra en la figura 3. Se sembraron aproximadamente  $1-2 \times 10^6$  células pancreáticas (Panc-1) en un matraz de cultivo tisular para los grupos de tratamiento. El protocolo de ensayo fue como se ha mencionado anteriormente en "análisis de distribución del ciclo celular y citometría de flujo". El ciclo celular se dividió en cuatro partes, que se representan en la figura como M1, M2, M3 y M4. M1 corresponde a la fase G<sub>1</sub>, M2 a la fase S, M3 a la fase G<sub>2</sub>-M y M4 a la fase sub G<sub>1</sub>, que representa las células que experimentan apoptosis. El control de 96 horas en el que no hubo tratamiento farmacológico mostró apoptosis insignificante de solamente 2,1 %, mientras que el grupo de tratamiento con uno de los fármacos solo mostró 4,3 % y 1,7 % de apoptosis para el compuesto A y gemcitabina respectivamente. La combinación de ambos fármacos mostró una apoptosis aumentada del 25,4 %.

#### **Ejemplo 13:**

##### **Tinción con anexina V-FITC (Para la detección de apoptosis temprana)**

**[0069]** Anexina V-FITC es una sonda sensible para identificar células apoptóticas. Durante la apoptosis temprana el fosfolípido de membrana fosfatidil serina (PS) se transloca de la capa interior a la exterior de la membrana plasmática, exponiendo de este modo PS al ambiente celular externo. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos de calcio 35-36 kDa que tiene una afinidad alta por PS y se une a células con PS expuesta. El yoduro de propidio (PI) es un colorante polar que entra en las células a través de membranas permeables y por lo tanto se usa junto con FITC para la detección de apoptosis tardía.

**[0070]** Las H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron en matraces de cultivo tisular de 25 mm<sup>3</sup>. Después de 24 horas, las células se trataron con compuesto A 1200 nM o doxorubicina 100 nM solos durante 96 horas y 24 horas respectivamente. Para los estudios de combinación, las células se trataron en primer lugar con agente antineoplásico citotóxico doxorubicina 100 nM durante 24 horas seguido de compuesto A 1200 nM durante 96 horas después de la retirada del agente antineoplásico citotóxico (doxorubicina) y lavado de las

células una vez con medio. Las células de control se dejaron sin tratar durante 120 horas. Se recogió el medio que contenía células flotantes y se agrupó con las células adherentes después de recoger con tripsina en los diferentes puntos temporales. Las células se lavaron dos veces con PBS frío con centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular se resuspendió en tampón de unión 1 x (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se tiñeron 100  $\mu$ l de la solución ( $1 \times 10^5$  células) con Anexina V-FITC y yoduro de propidio. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y la muestra se analizó por citometría de flujo.

**[0071]** Se usó un citómetro de flujo FACS Calibur de Becton Dickinson para esos estudios de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El láser iónico de argón ajustado a 488 nm se usó como una fuente de excitación. La Figura 4 muestra la distribución de células en cuatro cuadrantes. El cuadrante 1 situado en la esquina inferior izquierda (II) muestra células, que son negativas para FITC y PI lo que indica que las células están sanas. El cuadrante II situado en la esquina inferior derecha (ID) son células, que son positivas solamente para PI lo que indica que estas células son completamente apoptóticas. El cuadrante III en la esquina superior derecha (SD) son células que son positivas para tanto anexina como PI lo que indica que estas células están entrando de apoptosis temprana a apoptosis tardía. El cuadrante IV en la esquina superior izquierda (SI) muestra células que son solamente positivas para anexina, lo que indica que estas células están en apoptosis temprana.

**[0072]** Si las células incluso después de la terminación de la exposición del compuesto continúan entrando en apoptosis, se teñirían positivas para anexina. Una vez que las células están en apoptosis temprana se comprometen a muerte celular programada y están en un punto de no retorno. Los resultados son como se indica en la Tabla 10. Se descubrió que el mayor porcentaje de células en la combinación están en apoptosis temprana o de temprana a tardía en comparación con uno de los fármacos solo.

Tabla 10

| Tratamiento Farmacológico                               | Células vivas (%) (células sanas) | Anexina + ve (%) (células en apoptosis temprana) | Anexina y PI + ve (%) (células en apoptosis temprana a tardía) | PI + ve (%) (células muertas) |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Control                                                 | 90,5                              | 3                                                | 4                                                              | 2,3                           |
| Doxorrubicina (100 nM)                                  | 60                                | 30,4                                             | 8,6                                                            | 1                             |
| Inhibidor de CDK (compuesto A) (1200 nM)                | 53                                | 38,5                                             | 8,2                                                            | 0,3                           |
| Doxorrubicina seguido de inhibidor de CDK (compuesto A) | 14,1                              | 58,2                                             | 27,3                                                           | 1                             |

#### Ejemplo 14:

#### Ensayo clonogénico:

**[0073]** Se sembraron células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460) a una densidad de 750-1000 células por placa de uso en cultivo tisular de 35 mm. Se incubaron durante una noche a 37 °C para que las células se unieran a la placa. Las células se trataron con agente antineoplásico citotóxico durante 24 horas seguido de lavar las células y añadir medio nuevo que contenía el compuesto A durante 96 horas. Al final del tratamiento el medio se reemplazó de nuevo por medio completo nuevo que contenía GCS 10 % y se incubó durante 7-14 días para formación de colonias. Una vez que aparecieron colonias visibles en la placa, el medio se retiró y las colonias se fijaron con mezcla de metanol:ácido acético en la relación de 2:1 durante 5 minutos. Las placas se lavaron con agua y se repitió el procedimiento de fijación. Las placas se secaron y las colonias se tiñeron con tinción de violeta cristal 0,1 % durante 3-5 minutos. Las placas se aclararon cuidadosamente con agua, se secaron y las colonias se contaron en el Geldoc.

**[0074]** Las células se trataron con compuesto A 1200 nM o doxorubicina 100 nM solos durante 96 horas y 24 horas respectivamente o en combinación de doxorubicina 100 nM seguido de compuesto A 1200 nM durante 96 horas. La Figura 5 indica un efecto sinérgico de la combinación puesto que solo se vio una colonia en la combinación en comparación con el control o uno de los fármacos por sí solo.

**Experimentos de recuperación después del tratamiento**

**[0075]** El protocolo de ensayo para tratamiento de células con compuesto A y doxorubicina solos o en combinación fue el mismo que se ha descrito en el análisis de distribución de ciclo celular. Después del tratamiento farmacológico, se permitió que las células se recuperaran en medio completo nuevo que contenía FCS 10 %. Las células en recuperación se analizaron por FACS en puntos temporales de 0, 6, 18, 24 y 48 horas para uno de los fármacos solo y el tratamiento de combinación. En los siguientes Ejemplos, la recuperación de las células se representa por el porcentaje de células que experimentan apoptosis.

**Ejemplo 15:**

**[0076]** Las células se trataron solamente con el agente antineoplásico citotóxico, doxorubicina durante 24 horas seguido de retirada del medio y reemplazo con medio completo nuevo. El análisis de FACS se realizó como se describe en el método especificado para determinar el porcentaje de células que experimentan apoptosis durante el periodo de recuperación después del final del tratamiento farmacológico. La apoptosis se determinó a 0, 6, 18, 24 y 48 horas durante el periodo de recuperación. Al final de 24 horas de tratamiento farmacológico el porcentaje de apoptosis fue del 3 %, que no aumenta significativamente durante el periodo de recuperación lo que indica que las células se recuperan en última instancia del tratamiento farmacológico. Los resultados son como se indica en la Tabla 11.

**Tabla 11**

| <b>Recuperación de células a 0, 6, 18, 24 y 48 horas después del tratamiento solamente con el agente antineoplásico citotóxico, doxorubicina durante 24 horas.</b> |                       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>Tratamiento farmacológico (Doxorrubicina 100 nM durante 24 horas)</b>                                                                                           | <b>% de Apoptosis</b> |
| Recuperación de 0 horas                                                                                                                                            | 3                     |
| Recuperación de 6 horas                                                                                                                                            | 5                     |
| Recuperación de 18 horas                                                                                                                                           | 4                     |
| Recuperación de 24 horas                                                                                                                                           | 5                     |
| Recuperación de 48 horas                                                                                                                                           | 4                     |

**Ejemplo 16:**

**[0077]** El ensayo se realizó como se describe en el protocolo. Las células se trataron solamente con el compuesto A durante 96 horas seguido de retirada de medio y reemplazo con medio completo nuevo. El análisis de FACS se realizó como se ha descrito en el método dado para determinar el porcentaje de células que experimentan apoptosis durante el periodo de recuperación después del final del tratamiento farmacológico. La apoptosis se determinó a 0, 6, 18, 24 y 48 horas durante el periodo de recuperación. Al final de 96 horas del tratamiento farmacológico el porcentaje de apoptosis fue del 32 %, que durante el periodo de recuperación se reduce del 24 % al 19 % al final de 48 horas de recuperación, lo que indica que las células se recuperan gradualmente con aumento del periodo de recuperación. Los resultados son como se indica en la Tabla 12.

**Tabla 12**

| <b>Recuperación de células a 0, 6, 18, 24 y 48 horas después del tratamiento solamente con compuesto A durante 96 horas.</b> |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <b>Tratamiento farmacológico (Compuesto A 1200 nM durante 96 horas)</b>                                                      | <b>% de Apoptosis</b> |
| Recuperación de 0 horas                                                                                                      | 32                    |
| Recuperación de 6 horas                                                                                                      | 24                    |
| Recuperación de 18 horas                                                                                                     | 23                    |
| Recuperación de 24 horas                                                                                                     | 21                    |
| Recuperación de 48 horas                                                                                                     | 19                    |

**Ejemplo 17:**

**[0078]** El ensayo se realizó como se describe en el protocolo. Las células se trataron con doxorubicina durante 24 horas seguido de compuesto A durante 96 horas seguido de retirada del medio y reemplazo con medio completo nuevo. El análisis de FACS se realizó como se ha descrito en el método dado para determinar el porcentaje de

células que experimentan apoptosis durante el periodo de recuperación después del final del tratamiento farmacológico. La apoptosis se determinó a 0, 6, 18, 24 y 48 horas durante el periodo de recuperación. Al final del tratamiento farmacológico el porcentaje de apoptosis fue del 55 %. Durante el periodo de recuperación un 32 % adicional entra en la apoptosis al final de 6 horas, lo que aumenta al 57 % al final de 48 horas de recuperación, lo que indica que las células no se recuperan sino que continúan experimentando apoptosis durante el periodo de recuperación. Los resultados son como se indica en la Tabla 13.

Tabla 13

| Recuperación de células a 0, 6, 18, 24 y 48 horas después del tratamiento con doxorrubicina durante 24 horas seguido de compuesto A durante 96 horas. |                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Tratamiento farmacológico (Doxorrubicina 100 nM durante 24 horas seguido del Compuesto A 1200 nM durante 96 horas)                                    | % de Apoptosis |
| Recuperación de 0 horas                                                                                                                               | 55             |
| Recuperación de 6 horas                                                                                                                               | 32             |
| Recuperación de 18 horas                                                                                                                              | 34             |
| Recuperación de 24 horas                                                                                                                              | 49             |
| Recuperación de 48 horas                                                                                                                              | 57             |

#### Ejemplo 18:

##### Análisis de transferencia de Western:

**[0079]** Las células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460) eran células no tratadas, es decir control, o tratadas con doxorrubicina 100 nM solo durante 24 horas o con compuesto A 1200 nM solo o durante 96 horas. En el tratamiento de combinación, las células se trataron en primer lugar con doxorrubicina 100 nM durante 24 horas seguido de compuesto A 1200 nM durante 96 horas. Al final del periodo de tratamiento las células se lisaron y se estimó el contenido proteico del lisado usando el reactivo de Bradford. Se cargaron 40 µg de proteína en SDS-PAGE y se transfirieron a membrana PVDF. Las membranas se exploraron con anticuerpos de p53, Bax, Bcl-2, ciclina D1, Cdk1 y actina. El anticuerpo primario se detectó con anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano rusticano y se sometió a reactivos de quimioluminiscencia west pico.

**[0080]** La Figura 6 muestra el análisis de transferencia de western de las diversas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y apoptosis. Se cargó una cantidad igual de proteína en los cuatro carriles. Las diferentes muestras cargadas en los pocillos se describen en la leyenda de la figura. Los resultados indican que la proteína antiapoptótica Bcl-2 se reguló negativamente de forma significativa en el tratamiento de combinación en comparación con uno de los fármacos solamente que era casi equivalente al control. Esto se correlaciona con el aumento de apoptosis visto en el tratamiento de combinación en análisis de FACS. La proteína proapoptótica Bax se regula de forma ligeramente positiva con respecto al control en todas las muestras de tratamiento. La proteína supresora de tumores p53 se reguló positivamente de forma significativa en el tratamiento de combinación en comparación con el control pero no tanto en los otros dos grupos de tratamiento. Cdk1-B1 es un iniciador de mitosis. La desregulación de esta enzima conduce a tumorogénesis. Por lo tanto la inhibición de Cdk1 inhibirá su actividad y por lo tanto el inicio de mitosis y proliferación celular. La figura indica que la doxorrubicina induce significativamente niveles de Cdk1 mientras que la adición del compuesto A reduce Cdk1 a niveles insignificantes evitando de este modo que las células entren en mitosis. El compuesto A por sí solo mostró niveles iguales al control. Los niveles de ciclina D1 no muestran cambio significativo en los diversos grupos de tratamiento. En el tratamiento de combinación los niveles fueron equivalentes al control mientras que en el compuesto A y doxorrubicina solos se vieron reducciones ligeras de los niveles.

#### Ejemplo 19:

**[0081]** Este ejemplo muestra el ensayo de eficacia *in vivo* de la combinación de doxorrubicina y el inhibidor de CDK, el compuesto A en modelo de xenotrasplante de pulmón de células no pequeñas (H-460).

**[0082]** Se usó la línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Estados Unidos, para este estudio. Se preparó doxorrubicina y el compuesto A para administración i.p. disolviendo los compuestos en solución salina.

**[0083]** Se usó un grupo de 36 ratones macho inmunodeficientes Combinados Graves SCID que pesaban ~20 g de 6-8 semanas de edad.

**[0084]** Se cultivaron células de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460) en medio RPMI 1640 que contenía suero de ternero fetal 10 % en incubador de CO<sub>2</sub> 5 % a 37 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en solución salina para obtener una cuenta de  $25 \times 10^6$  células por ml, se inyectaron 0,2 ml de esta suspensión celular por vía subcutánea (s.c.) en ratones SCID. Los ratones se observaron cada día alterno con respecto a masa tumoral palpable. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó un tamaño de 5-7 mm de diámetro, los animales se agruparon aleatoriamente en grupos de tratamiento respectivos como se indica en la siguiente Tabla 14. Se administró doxorrubicina una vez cada semana mientras que el compuesto A se administró una vez cada día durante 5 días como se indica en la Tabla 15. La primera dosis de doxorrubicina se siguió del compuesto A después de un intervalo de 6 horas, seguido del compuesto A cada día durante un periodo de 5 días que comprendía un ciclo. Después de un hueco de dos días comenzaría el siguiente ciclo. El tratamiento comprendió en total 2 ciclos. Se registró el peso corporal cada día. El tamaño del tumor y otros signos de toxicidad se registraron cada dos días. No se vio pérdida de peso significativa o señales de morbilidad. El peso tumoral (mg) se estimó de acuerdo con la fórmula para un elipsoide alargado:  $\{Longitud (mm) \times [anchura (mm)^2] \times 0,5\}$  suponiendo que la gravedad específica es uno y que  $\pi$  es tres. El crecimiento del tumor en animales tratados con compuestos se calculó como T/C (Tratado/Control) x 100 % y el Porcentaje de inhibición del Crecimiento (% GI) fue  $[100-T/C \%]$ . Los resultados se presentan gráficamente en las figuras 7a, 7b, 8 y 9.

**Tabla 14**  
**Grupos de tratamiento**

| Grupos | Tratamiento farmacológico | Dosis        | Vía  | Nº de tratamientos          | n= |
|--------|---------------------------|--------------|------|-----------------------------|----|
| I      | Control (sin tratar)      | -            | i.p. |                             | 8  |
| II     | Doxorrubicina             | 2 mpk        | i.p. | Una vez por semana (2 s)    | 8  |
| III    | Compuesto A               | 20 mpk       | i.p. | Cinco días por semana (2 s) | 8  |
| IV     | Compuesto A               | 35 mpk       | i.p. | Cinco días por semana (2 s) | 8  |
| V      | Doxo > Compuesto A        | 2 mpk>20 mpk | i.p. | Cinco días por semana (2 s) | 8  |
| VI     | Doxo > Compuesto A        | 2 mpk>35 mpk | i.p. | Cinco días por semana (2 s) | 8  |

Doxo - doxorrubicina, s – semana, i.p. = vía intraperitoneal  
 ">" indica que la doxorrubicina se administra antes que el compuesto A.

**Tabla 15**

| Ciclo de Dosificación (Un ciclo) |                     |     |   |   |   |   |
|----------------------------------|---------------------|-----|---|---|---|---|
| Grupos                           | Descripción         | L   | M | X | J | V |
| Grupo I                          | Sin tratar          | S   | S | S | S | S |
| Grupo II                         | Doxorrubicina 2 mpk | D   | - | - | - | - |
| Grupo III                        | Compuesto A 20 mpk  | P   | P | p | p | P |
| Grupo IV                         | Compuesto A 35 mpk  | P   | P | p | p | P |
| Grupo V                          | D>P:2mpk>20mpk      | D/P | P | p | p | P |
| Grupo VI                         | D>P:2mpk>35mpk      | D/P | P | p | p | P |

S – Solución salina, P - Compuesto A, D - Doxorrubicina  
 L, M, X, J y V: Días de la semana (Lunes, Martes, Miércoles, Jueves y Viernes)  
 ">" indica que la doxorrubicina se administra antes que el compuesto A.

#### Ejemplo 20:

#### 25 Análisis de transferencia de Western usando anticuerpo de COX-2

**[0085]** La Figura 9 indica análisis de transferencia de western usando anticuerpo de COX-2. Las diferentes muestras cargadas en los pocillos se describen en la leyenda de la figura. Los resultados indican que:

- El control mostró niveles basales de COX-2, que son bajos.
- El compuesto A solo también mostró niveles bajos de COX-2.
- La doxorubicina indujo fuertemente COX-2 que es responsable de quimiorresistencia mediante la ruta de señalización de NFκB.
- La adición de compuesto A después de doxorubicina reguló negativamente de forma significativa COX-2.

[0086] Por lo tanto, la inhibición mediada por NFκB de COX-2 por el compuesto A podría estar implicada en la supresión del crecimiento tumoral y quimiorresistencia inducida por doxorubicina en xenotrasplante de tumor de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460).

#### Ejemplo 21:

#### Estudios de combinación de Doxorubicina y Flavopiridol en línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano (H-460)

[0087] Este ejemplo muestra que no hay efecto sinérgico cuando se administra flavopiridol después (Tabla 16A), antes (Tabla 16B) o conjuntamente (Tabla 16C) con el agente antineoplásico citotóxico, doxorubicina. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Según la Tabla 16A las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorubicina o flavopiridol solo. El tratamiento con doxorubicina fue durante las primeras 24 horas seguido de medio completo durante 96 horas mientras que en el caso de flavopiridol, las primeras 24 horas fue en medio completo seguido de flavopiridol durante las siguientes 96 horas. Las concentraciones de doxorubicina usadas fueron 30 nM, 70 nM, 100 nM y 200 nM mientras que se usó flavopiridol a una concentración de 200 nM y 350 nM (concentraciones  $CI_{30}$  y  $CI_{50}$  respectivamente después de 48 horas de tratamiento). En el estudio de combinación, las células se trataron en primer lugar con doxorubicina 30 nM, 70 nM, 100 nM y 200 nM durante las primeras 24 horas seguido de flavopiridol 200 nM y 350 nM durante 96 horas. Después de la compleción del tratamiento con fármacos, es decir después de 120 horas, las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados con como se muestra en la Tabla 16A.

[0088] Según la Tabla 16B las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorubicina o flavopiridol solo. El tratamiento de flavopiridol fue durante las primeras 96 horas seguido de medio completo durante 24 horas mientras que en el caso de doxorubicina, las primeras 96 horas fue en medio completo seguido de doxorubicina durante 24 horas. Las concentraciones de doxorubicina usadas fueron 30 nM, 70 nM, 100 nM y 200 nM mientras que el flavopiridol se usó a una concentración de 200 nM y 350 nM (concentración  $\sim CI_{30}$  y  $\sim CI_{50}$  después de 48 horas de tratamiento). En este estudio de combinación, se añadió flavopiridol 200 nM o 350 nM durante las primeras 96 horas seguido de doxorubicina 30 nM, 70 nM, 100 nM y 200 nM durante 24 horas. Después de la compleción del tratamiento con fármacos, es decir después de 120 horas, las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados son como se muestra en la Tabla 16B.

[0089] La Tabla 16C no muestra efecto sinérgico de la combinación de doxorubicina y flavopiridol administrados simultáneamente durante 120 horas. Las células H-460 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humano se sembraron a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células se trataron en primer lugar con uno de los fármacos solo, es decir con doxorubicina o flavopiridol solos durante 120 horas cada uno. Las concentraciones de doxorubicina usadas fueron 30 nM, 70 nM, 100 nM y 200 nM mientras que el flavopiridol se usó a una concentración de 200 nM y 350 nM (concentración  $\sim CI_{30}$  y  $\sim CI_{50}$  después de 48 horas de tratamiento). En este estudio de combinación, se añadieron doxorubicina 30 nM, 70 nM, 100 nM o 200 nM y flavopiridol 200 nM o 350 nM respectivamente juntos durante 120 horas. Después de la compleción del tratamiento de fármacos, es decir después de 120 horas, las placas se procesaron para ensayo de viabilidad de MTS y el porcentaje de citotoxicidad se calculó en comparación con el control. Los resultados con como se muestra en la siguiente Tabla 16C.

**Tabla 16**  
**Estudios de combinación de Doxorrubicina y Flavopiridol en línea celular H-460**  
**A) Doxorrubicina seguido de inhibidor de CDK, flavopiridol**

| <b>Doxo (24 h) &gt; FP (350 nM) (96 h)</b> |            |                           |
|--------------------------------------------|------------|---------------------------|
| <b>Conc. Doxo.</b>                         |            | <b>% de Citotoxicidad</b> |
| 200 nM                                     | Doxo.      | 48                        |
|                                            | Doxo. > FP | 65                        |
| 100 nM                                     | Doxo.      | 16                        |
|                                            | Doxo. > FP | 38                        |
| 70 nM                                      | Doxo.      | 14                        |
|                                            | Doxo. > FP | 35                        |
| 30 nM                                      | Doxo.      | 0                         |
|                                            | Doxo. > FP | 16                        |
| FP                                         | 200 nM     | 17                        |

| <b>Doxo (24 h) &gt; FP (350 nM) (96 h)</b> |            |                           |
|--------------------------------------------|------------|---------------------------|
| <b>Conc. Doxo.</b>                         |            | <b>% de Citotoxicidad</b> |
| 200 nM                                     | Doxo.      | 48                        |
|                                            | Doxo. > FP | 75                        |
| 100 nM                                     | Doxo.      | 9                         |
|                                            | Doxo. > FP | 66                        |
| 70 nM                                      | Doxo.      | 12                        |
|                                            | Doxo. > FP | 71                        |
| 30 nM                                      | Doxo.      | 0                         |
|                                            | Doxo. > FP | 56                        |
| FP                                         | 350 nM     | 57                        |

5

**B) Flavopiridol seguido de doxorrubicina**

| <b>FP (96 h) (200 nM) &gt; Doxo (24 h)</b> |           |                           |
|--------------------------------------------|-----------|---------------------------|
| <b>Conc. Doxo.</b>                         |           | <b>% de Citotoxicidad</b> |
| 200 nM                                     | FP > Doxo | 26                        |
| 100 nM                                     | FP > Doxo | 26                        |
| 70 nM                                      | FP > Doxo | 26                        |
| 30 nM                                      | FP > Doxo | 24                        |
| FP                                         | 200 nM    | 29                        |

| <b>FP (96 h) (350 nM) &gt; Doxo (24 h)</b> |           |                           |
|--------------------------------------------|-----------|---------------------------|
| <b>Conc. Doxo.</b>                         |           | <b>% de Citotoxicidad</b> |
| 200 nM                                     | FP > Doxo | 80                        |
| 100 nM                                     | FP > Doxo | 75                        |
| 70 nM                                      | FP > Doxo | 79                        |
| 30 nM                                      | FP > Doxo | 77                        |
| FP                                         | 350 nM    | 73                        |

“>” indica que un fármaco se administra antes que el otro.

**C) Flavopiridol y doxorrubicina administrados simultáneamente**

| <b>Doxo + FP (350 nM) (120 h)</b> |           |                           |
|-----------------------------------|-----------|---------------------------|
| <b>Conc. Doxo.</b>                |           | <b>% de Citotoxicidad</b> |
| 200 nM                            | Doxo.     | 48                        |
|                                   | Doxo.+ FP | 68                        |
| 100 nM                            | Doxo.     | 24                        |
|                                   | Doxo.+ FP | 62                        |
| 70 nM                             | Doxo.     | 28                        |
|                                   | Doxo.+ FP | 65                        |
| 30 nM                             | Doxo.     | 2                         |
|                                   | Doxo.+ FP | 35                        |
| FP                                | 200 nM    | 39                        |

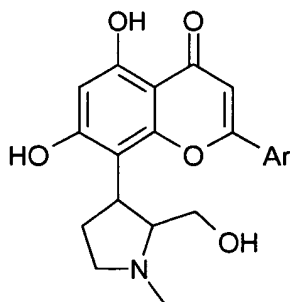
| <b>Doxo + FP (350 nM) (120 h)</b> |           |                           |
|-----------------------------------|-----------|---------------------------|
| <b>Conc. Doxo.</b>                |           | <b>% de Citotoxicidad</b> |
| 200 nM                            | Doxo.     | 48                        |
|                                   | Doxo.+ FP | 88                        |
| 100 nM                            | Doxo.     | 24                        |
|                                   | Doxo.+ FP | 85                        |
| 70 nM                             | Doxo.     | 28                        |
|                                   | Doxo.+ FP | 87                        |
| 30 nM                             | Doxo.     | 2                         |
|                                   | Doxo.+ FP | 80                        |
| FP                                | 200 nM    | 81                        |

10

Doxo = Doxorrubicina, FP = Flavopiridol  
 “+” Indica que los fármacos se administran simultáneamente.

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para su uso en el tratamiento de un cáncer; comprendiendo dicha combinación un agente antineoplásico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y gemcitabina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un inhibidor de CDK o una enantiómero o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que dicho inhibidor de CDK se representa por la siguiente fórmula I;



Fórmula I

en la que Ar es fenilo, que está no sustituido o sustituido por 1, 2 ó 3 sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados de: halógeno seleccionado de cloro, bromo, flúor o yodo, nitro, ciano, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo, trifluorometilo, hidroxilo, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alcoxi, carboxi, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alcoxycarbonilo, CONH<sub>2</sub>, y NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>; en los que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan de hidrógeno o C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo; en el que el uso de dicha combinación para el tratamiento de cáncer consiste en administrar dicho agente antineoplásico citotóxico antes que dicho inhibidor de CDK.

2. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de CDK es un compuesto de fórmula I en el que el grupo fenilo se sustituye por 1, 2, ó 3 sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados de: halógeno seleccionado de cloro, bromo, flúor o yodo, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alquilo o trifluorometilo.

3. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el inhibidor de CDK es un compuesto de fórmula I en el que el grupo fenilo se sustituye por 1, 2, ó 3 halógenos seleccionados de cloro, bromo, flúor o yodo.

4. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el inhibidor de CDK es un compuesto de fórmula I en el que el grupo fenilo se sustituye por cloro.

5. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el inhibidor de CDK es un compuesto de fórmula I en el que el grupo fenilo se sustituye por 1, 2, ó 3 grupos de trifluorometilo.

6. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de CDK representado por compuesto de fórmula I es (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi-metil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona o su sal farmacéuticamente aceptable.

7. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente antineoplásico citotóxico es paclitaxel.

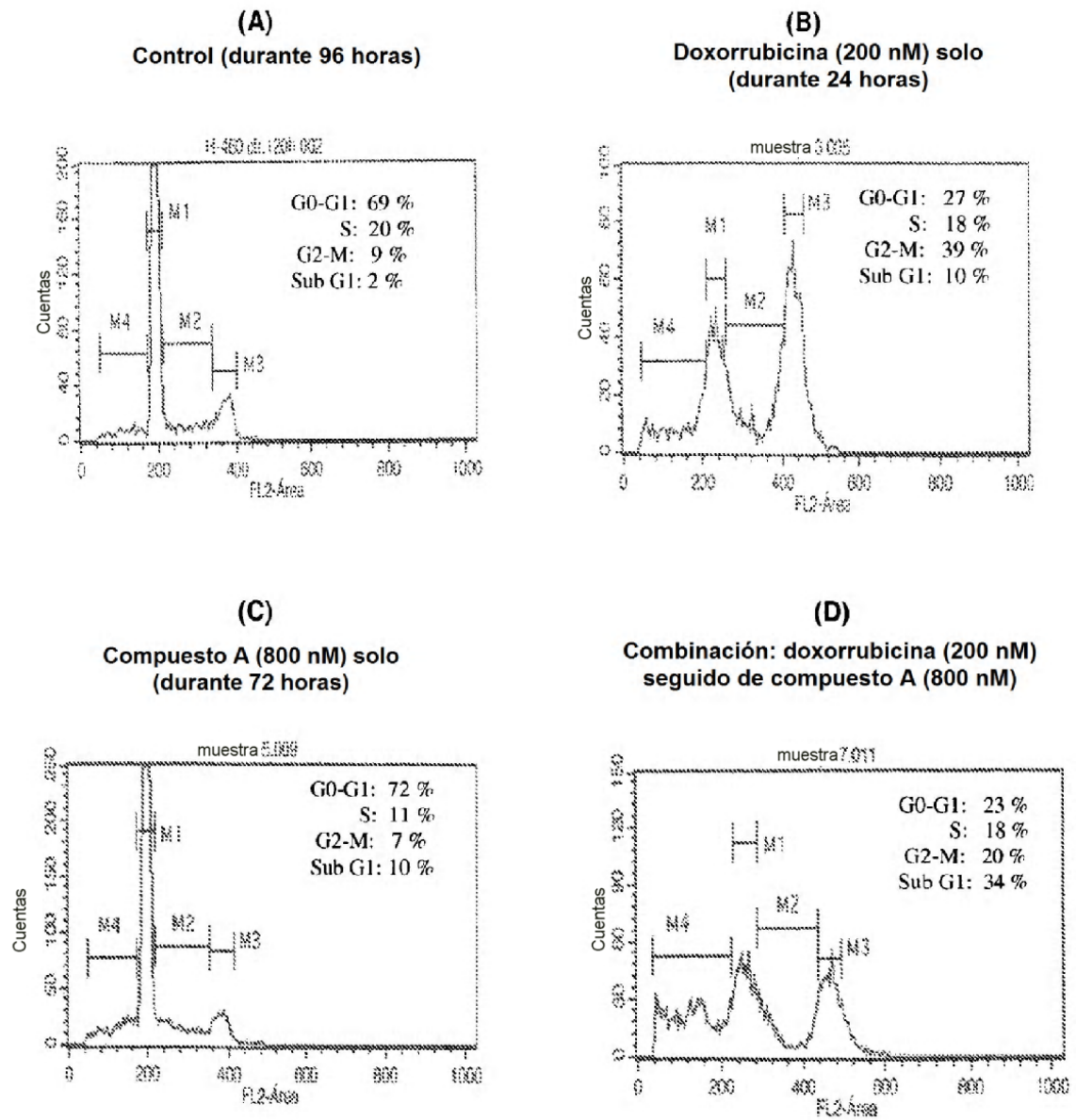
8. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente antineoplásico citotóxico es docetaxel.

9. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente antineoplásico citotóxico es doxorubicina.

10. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente antineoplásico citotóxico es gemcitabina.

11. La combinación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 10; en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y carcinoma hepatocelular.

12. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer pancreático.



**Figura 1**

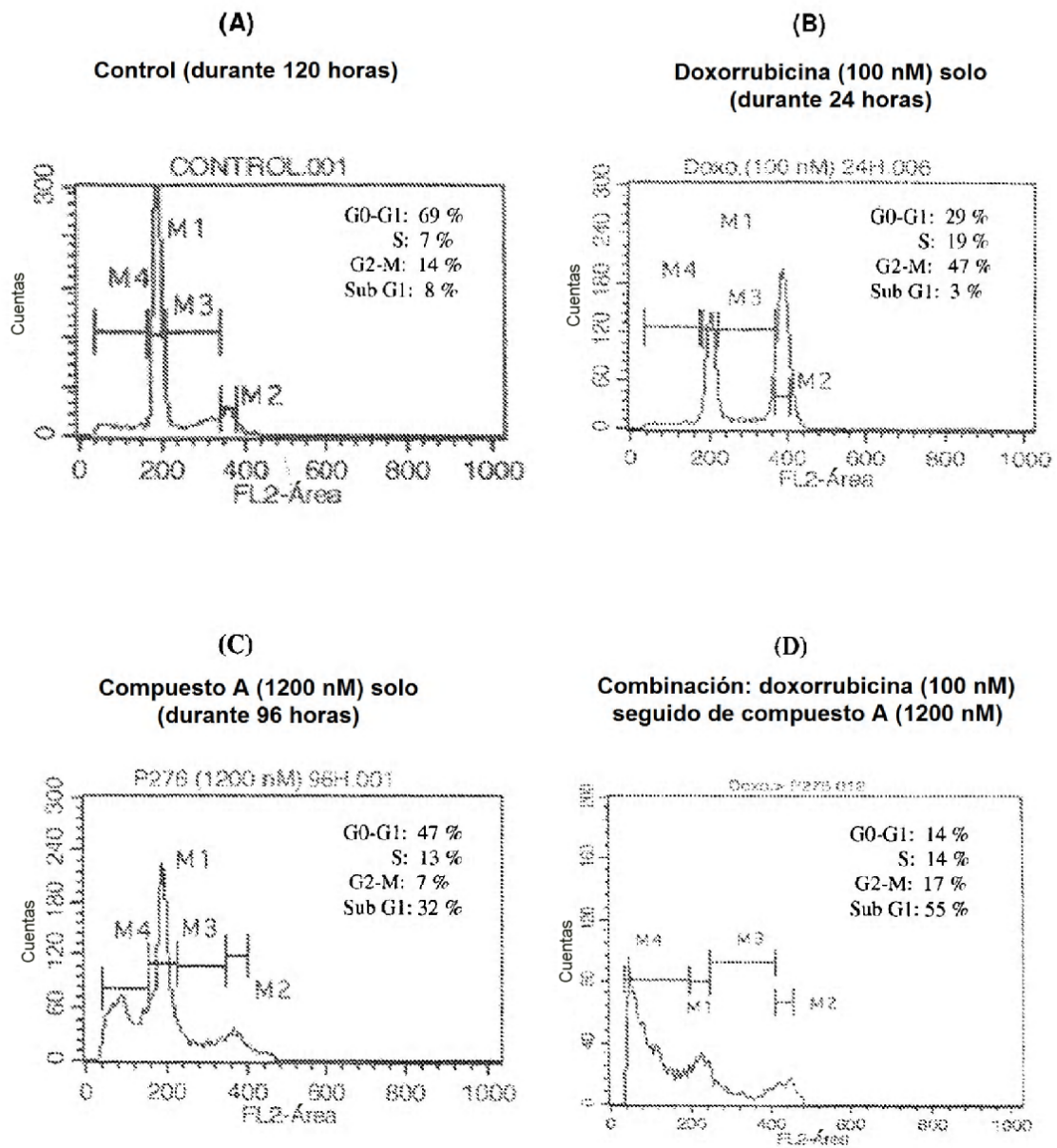
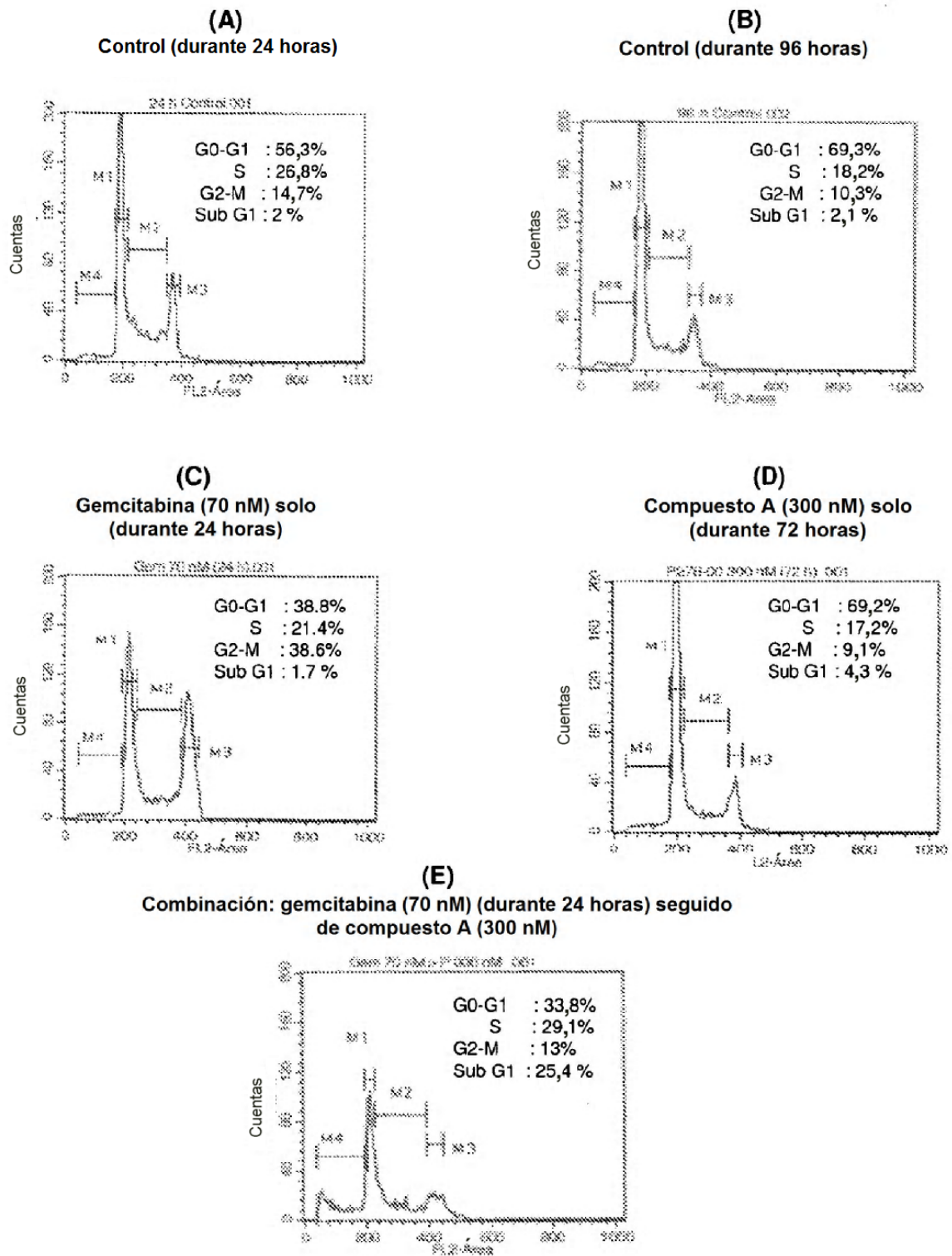
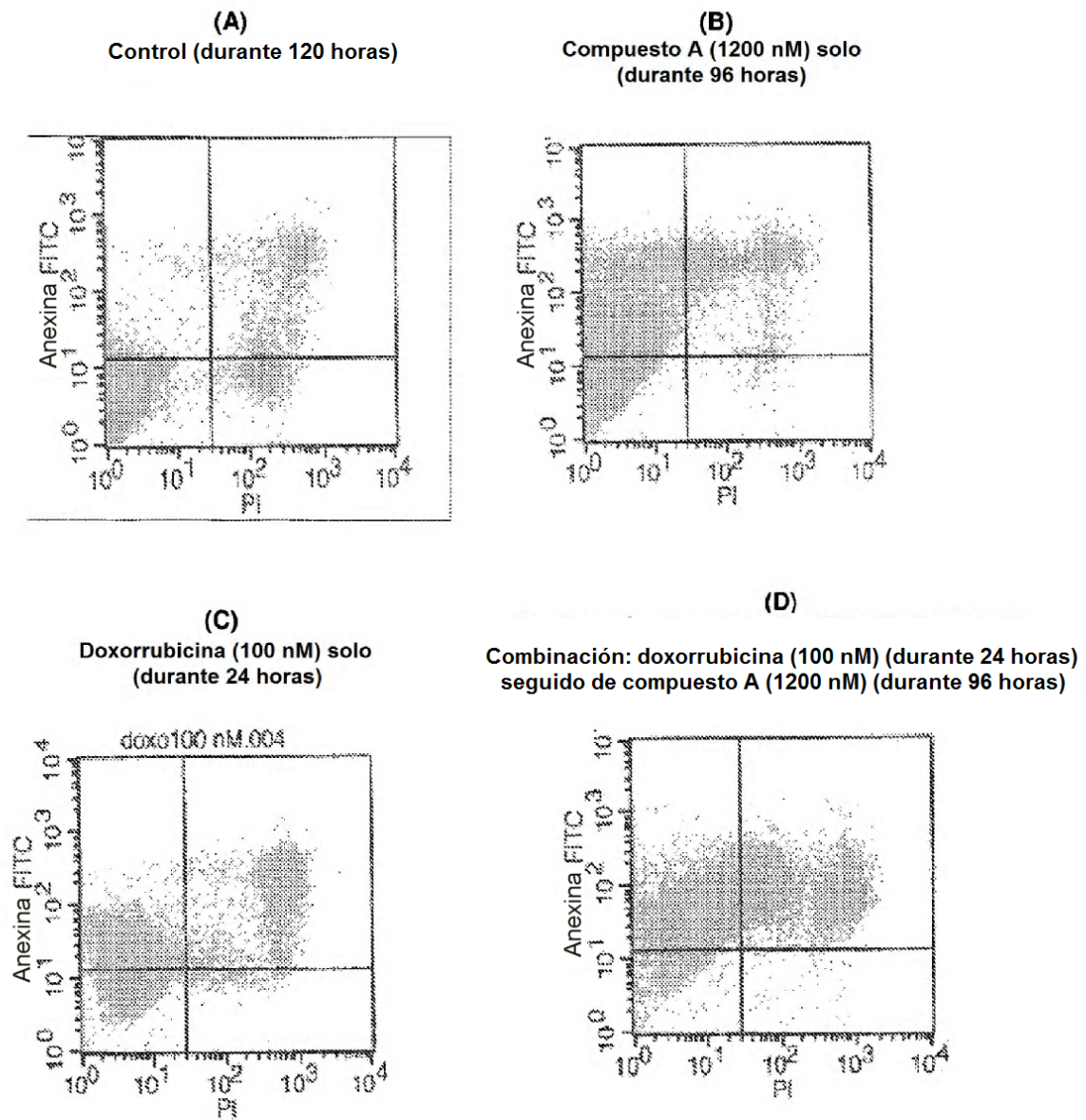


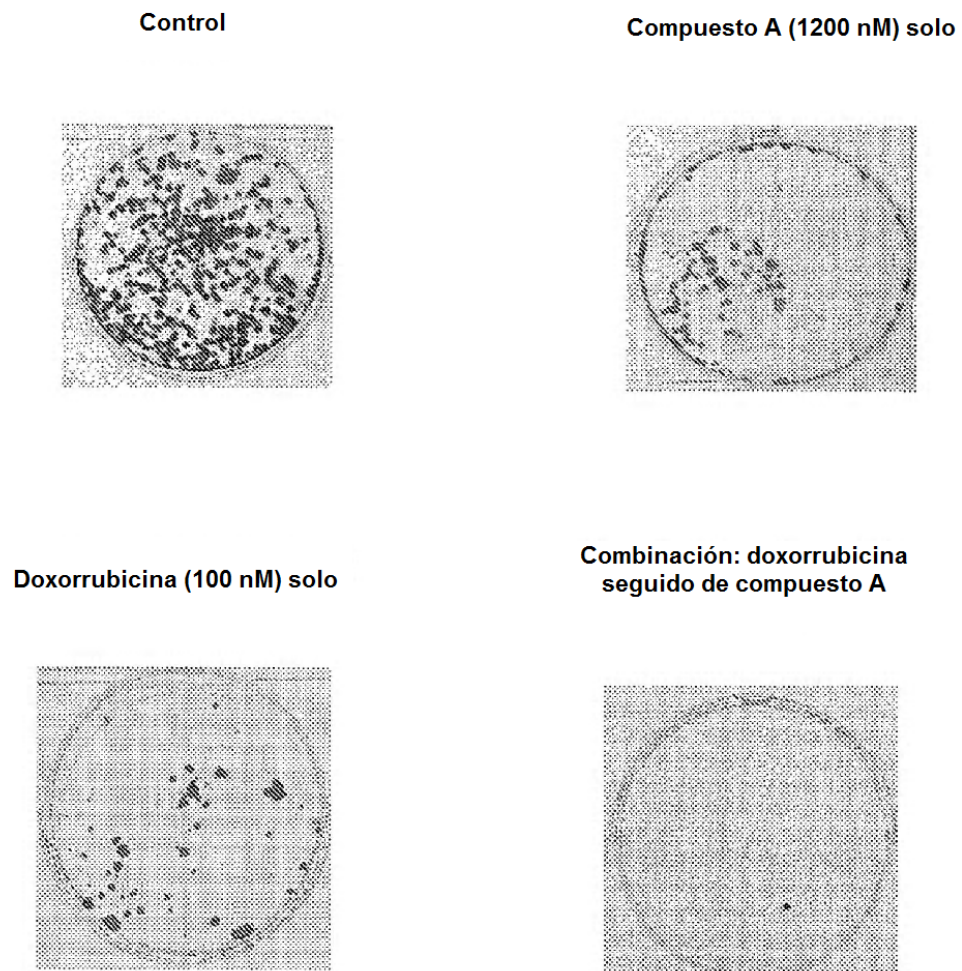
Figura 2



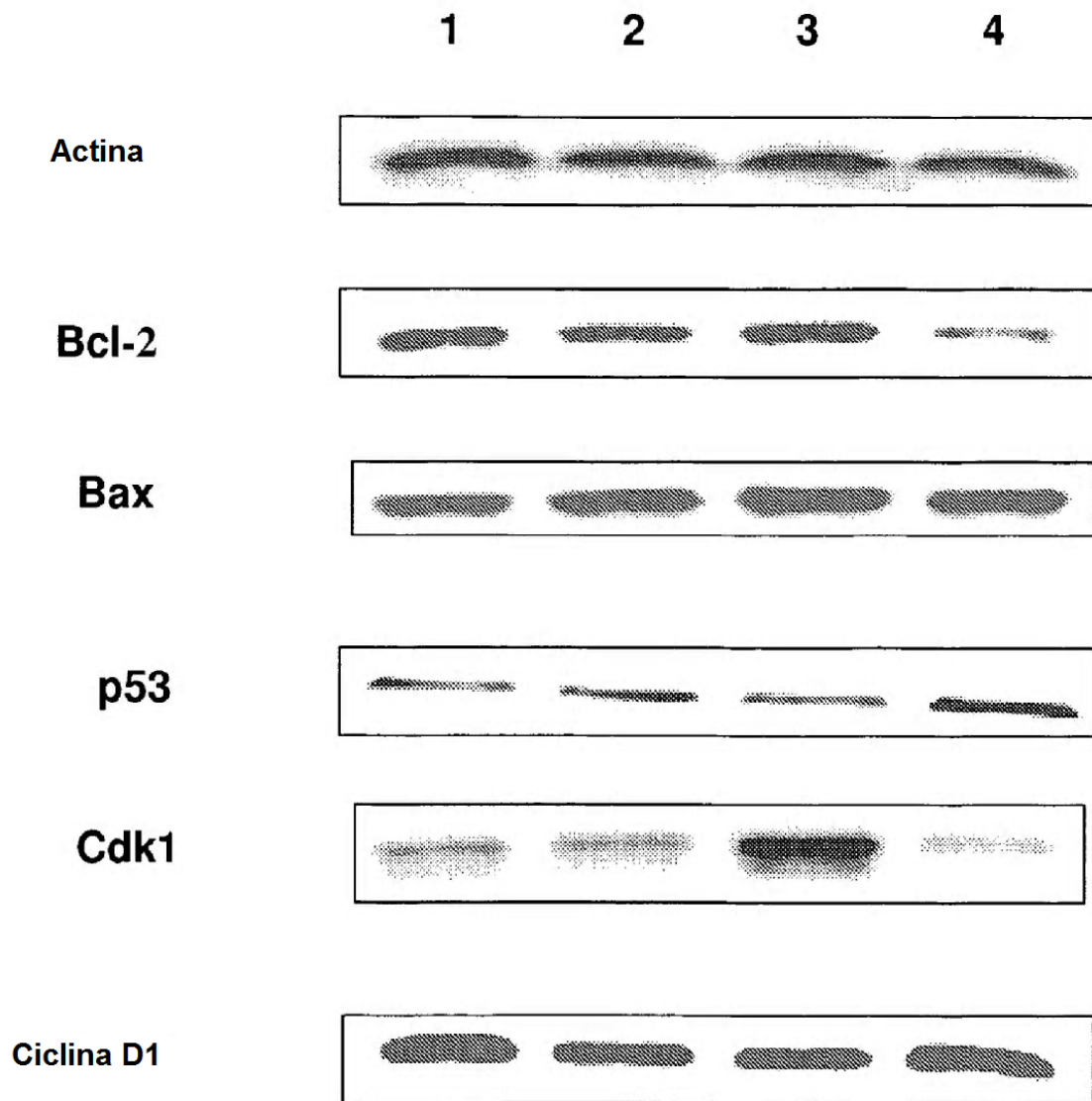
**Figura 3**



**Figura 4**

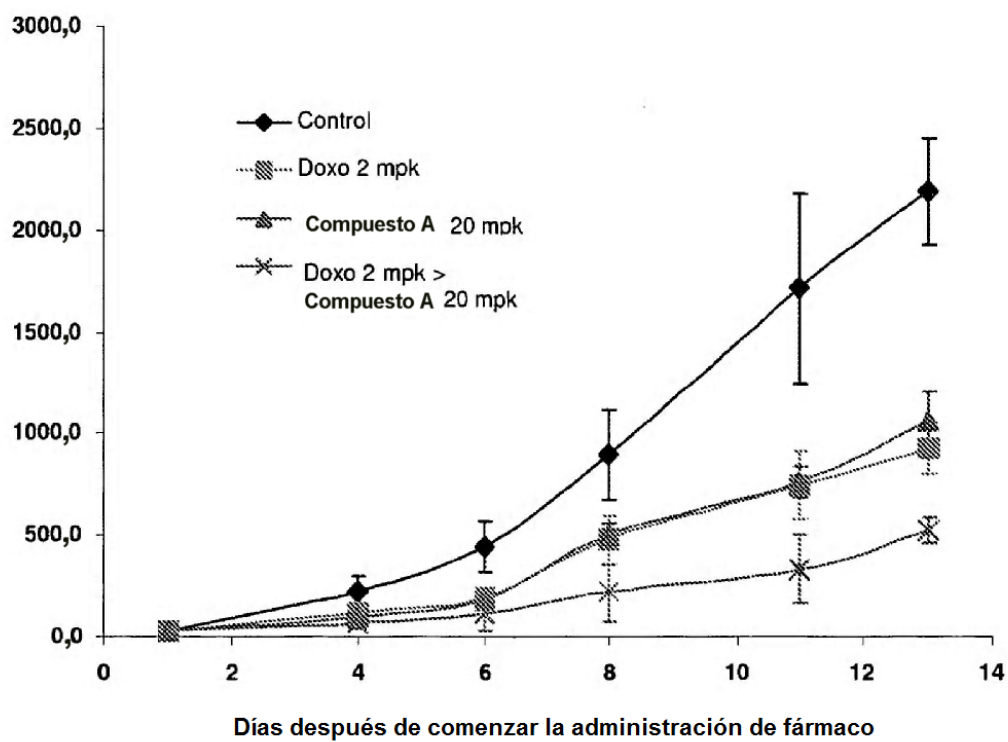


**Figura 5**



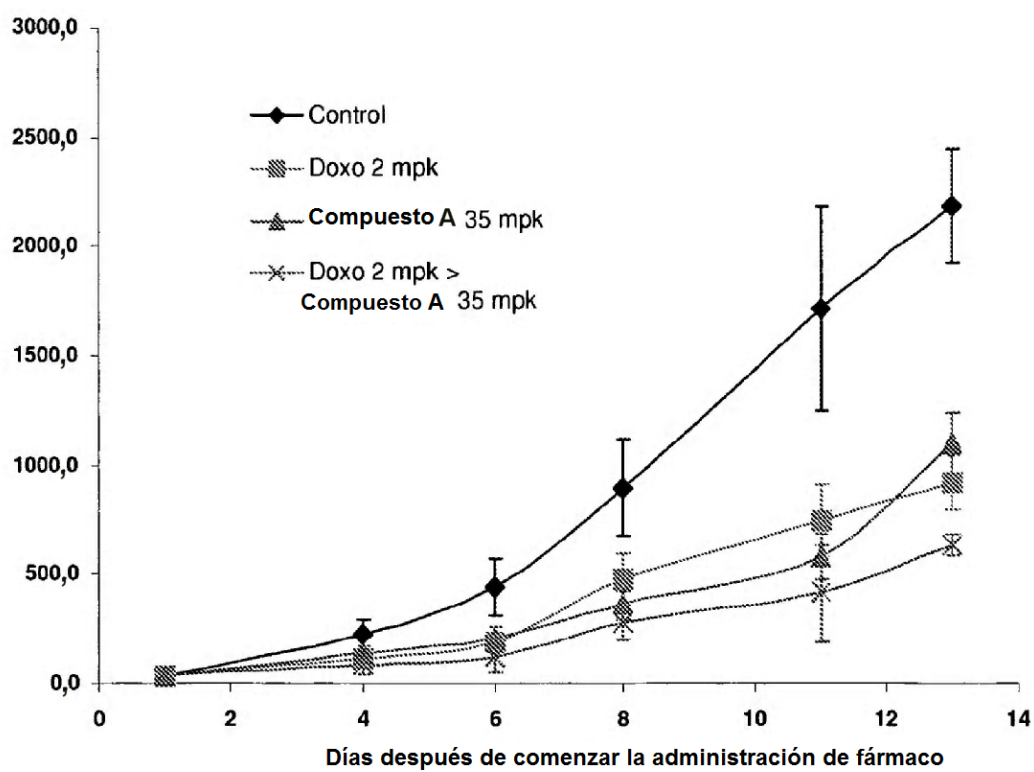
El carril 1 es control no tratado;  
 el carril 2 es compuesto A 1200 nM durante 96 horas;  
 el carril 3 es doxorubicina 100 nM sola durante 24 horas;  
 el carril 4 es la combinación de doxorubicina seguida de compuesto A

**Figura 6**



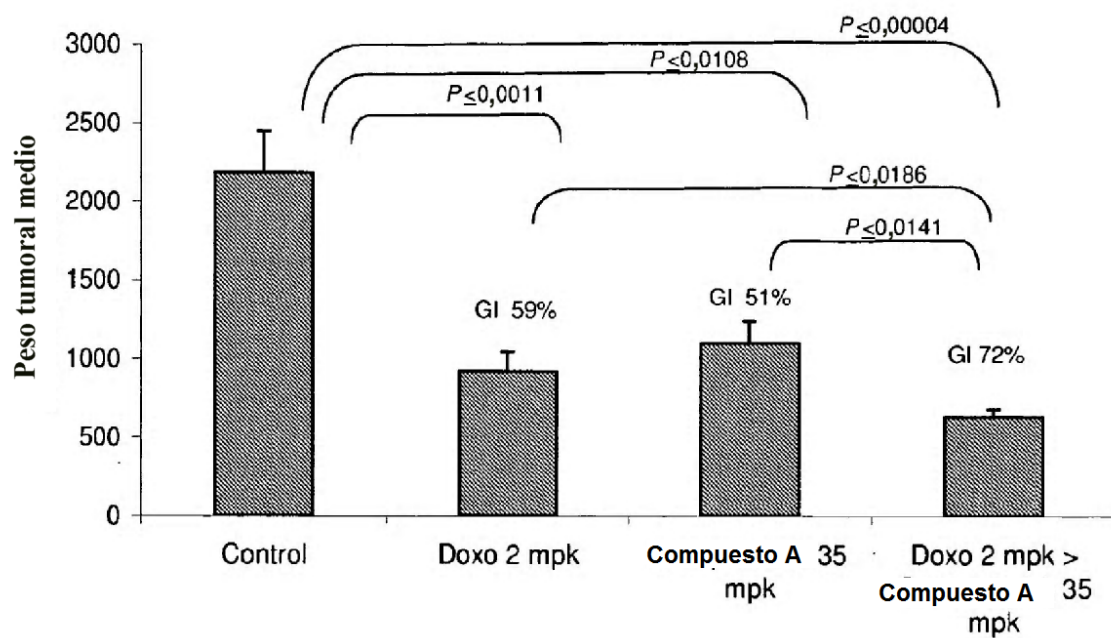
**Figura 7a**

En la Figura 7a, doxo se refiere a doxorubicina.



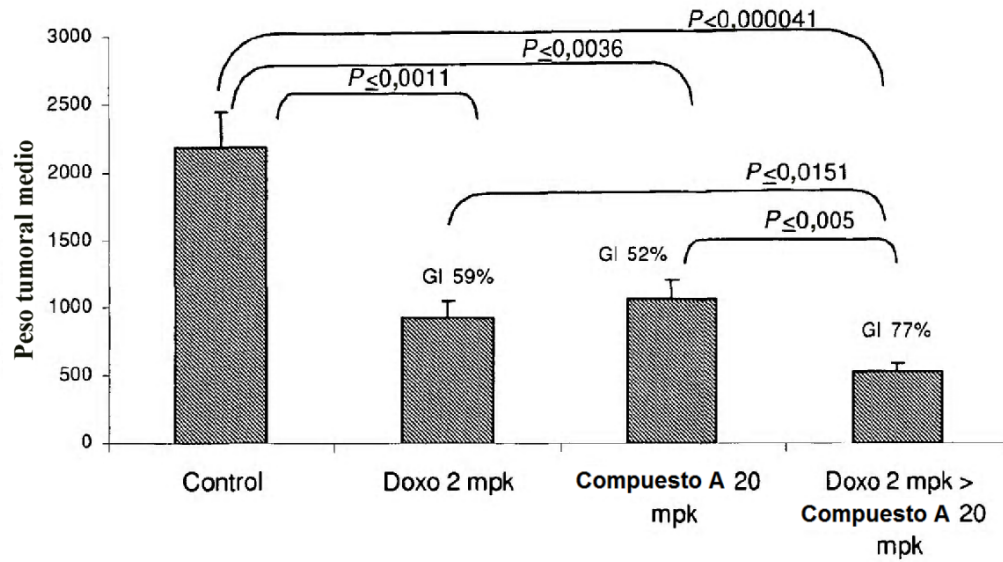
**Figura 7b**

En la Figura 7b, doxo se refiere a doxorubicina

**Figura 8a**

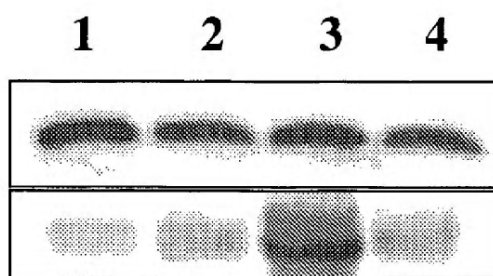
En la Figura 8a, doxo se refiere a doxorubicina

">" indica que se administra doxorubicina antes que el compuesto A



**Figura 8b**

En la Figura 8b, doxo se refiere a doxorubicina  
 ">" indica que se administra doxorubicina antes que el compuesto A



1- Control

2- Compuesto A (1200 nM) durante 96 horas

3- Doxorubicina (100 nM) durante 24 horas

4- Doxorubicina > Compuesto A

**Figura 9**

En la Figura 9, ">" indica que se administra doxorubicina antes que el compuesto A