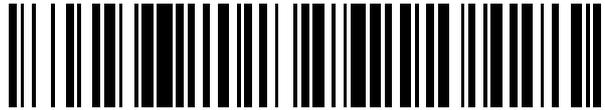


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 216**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2010 E 10775575 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2429566**

54 Título: **Inhibidores de cinasas dependientes de ciclina y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

13.05.2009 US 177724 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2016

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**SHARPLESS, NORMAN E.;
ROBERTS, PATRICK J.;
WONG, KWOK-KIN;
LIU, YAN y
JOHNSON, SOREN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 561 216 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de cinasas dependientes de ciclina y procedimientos de uso

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La materia presentemente desvelada se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina 4/6 (CDK4/6) para inducir quiescencia farmacológica en ciertas poblaciones de células madre y progenitoras en un sujeto mamífero y, de este modo, mejorar el desenlace clínico de este sujeto.

ABREVIACIONES

[0002]

15

% = porcentaje

µg = microgramo

20 µl = microlitro

µM = micromolar

2BrIC = 2-bromo-12,13-dihidro-5H-indol[2,3-a]pirrol[3,4]carbazol-5,6-diona

25

MO = médula ósea

CMN-MO = células mononucleares de médula ósea

30 BrdU = 5-bromo-2-desoxiuridina

NUS = nitrógeno ureico sanguíneo

CAFC = células formadoras de áreas en empedrado

35

HgC = hemograma completo

CDK = cinasa dependiente de ciclina

40 CDK4/6 = cinasa dependiente de ciclina 4 y/o cinasa dependiente de ciclina 6

CLP = progenitores linfoides comunes

CMP = progenitores mieloides comunes

45

SNC = sistema nervioso central

DMEM = medio de Eagle modificado por Dulbecco

50 DMSO = dimetilsulfóxido

ADN = ácido desoxirribonucleico

DOX = doxorubicina

55

EPO = eritropoyetina

Etop = etopósido

FACS = clasificación de células activada por fluorescencia

SBF = suero bovino fetal

5 g = gramo

CG = centro germinal

G-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos

10

GEMM = modelo murino manipulado por ingeniería genética

GM-CSF = factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

15

GMP = progenitores de granulocitos y monocitos

Gy = gray

h = horas

20

HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento

HSC = células madre hematopoyéticas

25

HSPC = células madre y progenitoras hematopoyéticas

CI₅₀ = concentración inhibitoria del 50 %

IHC = inmunohistoquímica

30

IL = interleucina

IP = intraperitoneal

35

RI = radiación ionizante

PTI = púrpura trombocitopénica idiopática

kg = kilogramo

40

LT-HSC = célula madre hematopoyética a largo plazo

MEP = progenitores de megacariocitos y eritrocitos

45

mg = miligramo

MPP = progenitor multipotente

nM = nanomolar

50

NP-CGG = nitrofenilacetil-gammaglobulina de pollo

PD = 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-ilpiridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3d]pirimidin-7-ona

55

(también denominada PD 0332991)

AR = artritis reumatoide

RB = proteína supresora tumoral del retinoblastoma

ULR = unidades lumínicas relativas

EEM = error estándar de la media

5

LES = lupus eritematoso sistémico

ST-HSC = célula madre hematopoyética a corto plazo

10 Sv = sievert

tHDF = fibroblasto diploide humano telomerizado

PTT = púrpura trombocitopénica trombótica

15

ANTECEDENTES

[0003] El tratamiento del cáncer incluye a menudo el uso de fármacos que dañan el ADN y/u otros agentes que dañan el ADN, como la radiación ionizante. Estos tratamientos pueden ser inespecíficos y, en particular en dosis altas, tóxicos para las células normales, de división rápida. Con frecuencia, esto ocasiona diversos efectos secundarios en los pacientes que reciben tratamiento contra el cáncer.

[0004] Por ejemplo, la depresión de la médula ósea, una fuerte reducción de la producción de células sanguíneas en la médula ósea, es uno de tales efectos secundarios. Se caracteriza por mielodepresión (anemia, neutropenia, agranulocitosis y trombocitopenia) y linfopenia. La neutropenia se caracteriza por una disminución selectiva del número de neutrófilos circulantes y un aumento de la predisposición a infecciones bacterianas. La anemia, una reducción del número de glóbulos rojos o eritrocitos, de la cantidad de hemoglobina o del volumen concentrado de glóbulos rojos (caracterizado por la determinación del hematocrito), afecta aproximadamente al 67 % de los pacientes de cáncer que reciben quimioterapia en los Estados Unidos. Véase BioWorld Today, página 4, 23 de julio de 2002. La trombocitopenia es una reducción del número de plaquetas con aumento de la propensión a hemorragias. La linfopenia es un efecto secundario común de la quimioterapia, caracterizado por la reducción del número de linfocitos circulantes (también denominados linfocitos T y B). Los pacientes linfopénicos tienen predisposición a una serie de tipos de infecciones.

[0005] Por lo tanto, el profesional médico típicamente tiene que sopesar la eficacia de las técnicas quimioterapéuticas y radioterapéuticas para destruir las células de proliferación anormal frente a los efectos citotóxicos asociados sobre las células normales. A causa de ello, el índice terapéutico de las técnicas de quimioterapia y radioterapia disminuye, lo que a menudo resulta en una reducción incompleta del tumor, una recidiva tumoral, un aumento de la carga tumoral y la inducción de tumores resistentes a quimioterapia y/o radiación.

40

[0006] Se han diseñado numerosos procedimientos en un esfuerzo para reducir el daño a los tejidos normales mientras todavía se administran dosis terapéuticamente eficaces de los agentes que dañan el ADN. Con respecto a la RI, estas técnicas incluyen la braquiterapia, la dosificación fraccionada y hiperfraccionada, complicados sistemas de programación y administración de las dosis y un tratamiento de alta tensión con un acelerador lineal. Sin embargo, tales técnicas solo intentan alcanzar un equilibrio entre los efectos terapéuticos y los efectos indeseados de la radiación y no se ha conseguido una eficacia plena.

[0007] Para reducir algunos de los efectos secundarios de ciertos compuestos quimioterapéuticos, se han usado moléculas pequeñas. Por ejemplo, se ha usado leucovorina para mitigar los efectos del metotrexato sobre las células de la médula ósea y las células de la mucosa gastrointestinal. Asimismo, se ha usado amifostina para reducir la incidencia de fiebre y mucositis relacionadas con la neutropenia en pacientes que reciben fármacos quimioterapéuticos alquilantes o con platino. Además, se ha usado dexrazoxano para proporcionar cardioprotección frente a compuestos contra el cáncer antraciclínicos. Desafortunadamente, es motivo de preocupación que muchos fármacos quimioprotectores, como dexrazoxano y amifostina, puedan disminuir la eficacia de la quimioterapia si se administran simultáneamente.

[0008] Otros tratamientos quimioprotectores adicionales incluyen el uso de factores de crecimiento. Hay factores de crecimiento hematopoyéticos disponibles en el mercado como proteínas recombinantes. Estas proteínas incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos

y macrófagos (GM-CSF) y sus derivados para el tratamiento de la neutropenia y la eritropoyetina (EPO) y sus derivados para el tratamiento de la anemia. Sin embargo, aunque los factores de crecimiento pueden apresurar la recuperación de algunos linajes de células sanguíneas, no tratan la reducción de las plaquetas, macrófagos ni linfocitos T o B.

5

[0009] Se ha demostrado que el inhibidor de cinasas no selectivo estaurosporina ofrece protección contra los agentes que dañan el ADN en algunos tipos de células cultivadas. Véase Chen y col., J. Natl. Cancer Inst., 92, 1999-2008 (2000); y Ojeda y col., Int. J. Radiat. Biol., 61, 663-667 (1992). La estaurosporina es un producto de origen natural y un inhibidor de cinasas no selectivo que se une a la mayoría de las cinasas con gran afinidad. Véase Karaman y col., Nat. Biotechnol., 26, 127-132 (2008). El tratamiento con estaurosporina puede desencadenar un conjunto de respuestas celulares, incluida la apoptosis, la parada del ciclo celular y el compromiso de los puntos de control del ciclo celular, dependiendo del tipo celular, la concentración del fármaco y la duración de la exposición. Por ejemplo, se ha demostrado que la estaurosporina sensibiliza las células a agentes que dañan el ADN como la radiación ionizante y la quimioterapia (véase Bernhard y col., Int. J. Radiat. Biol., 69, 575-584 (1996); Teyssier y col., Bull. Cancer, 86, 345-357 (1999); Hallahan y col., Radiat. Res., 129, 345-350 (1992); Zhang y col., J. Neurooncol., 15, 1-7 (1993); Guo y col., Int. J. Radiat. Biol., 82, 97-109 (2006); Bucher y Britten, Br. J. Cancer, 98, 523-528 (2008); Laredo y col., Blood, 84, 229-237 (1994); Luo y col., Neoplasia, 3, 411-419 (2001); Wang y col., Yao Xue Xue Bao, 31, 411-415 (1996); Chen y col., J. Natl. Cancer Inst., 92, 1999-2008 (2000); e Hirose y col., Cancer Res., 61, 5843-5849 (2001)) a través de varios mecanismos propuestos que incluyen la anulación de una respuesta del punto de control de G2. El mecanismo por el que el tratamiento con estaurosporina ofrece protección frente a los agentes que dañan el ADN en algunos tipos de células cultivadas no está claro, habiéndose sugerido algunos mecanismos posibles que incluyen la inhibición de la proteína-cinasa C o la disminución de los niveles proteínicos de CDK4. Véase Chen y col., J. Natl. Cancer Inst., 92, 1999-2008 (2000); y Ojeda y col., Int. J. Radiat. Biol., 61, 663-667 (1992). No se ha observado ningún efecto de la estaurosporina sobre los progenitores hematopoyéticos, ni tampoco se ha demostrado que el uso de la estaurosporina bastante después de la exposición a los agentes que dañan el ADN ofrezca protección. Además, la inhibición de cinasas no selectiva de la estaurosporina ha dado lugar a toxicidades significativas, con independencia de sus efectos sobre el ciclo celular (por ejemplo, hiperglucemia), después de su administración *in vivo* a mamíferos, y estas toxicidades han descartado su uso clínico.

[0010] Por consiguiente, existe una necesidad permanente de procedimientos prácticos para proteger a los sujetos para los que está previsto que experimenten, presentan riesgo de experimentar o han experimentado ya una exposición a agentes que dañan el ADN, así como de procedimientos para aumentar la eficacia de los agentes reductores de la toxicidad.

35 RESUMEN

[0011] Un objetivo de la materia presentemente desvelada es proporcionar una composición farmacéutica para uso en un procedimiento para aumentar la eficacia de los factores de crecimiento para el rescate y apoyo de las poblaciones de células hematopoyéticas en sujetos frente a los efectos de los agentes que dañan el ADN mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6.

[0012] Habiendo expuesto anteriormente en este documento un objetivo de la materia presentemente desvelada, el cual se consigue mediante la materia presentemente desvelada, otros objetivos serán evidentes a medida que proceda la descripción, tomada en conjunto con los dibujos acompañantes mejor descritos a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013]

50

Figura 1: La inhibición de CDK4/6 potencia la eficacia de la recuperación mediada por eritropoyetina del linaje celular eritrocítico después del daño en el ADN. Se administra a cohortes (ocho ratones por cohorte) de ratones de tipo natural (FVB/n) irradiados (6,5 Gy) placebo, eritropoyetina (EPO), un inhibidor de CDK4/6 (PD0332991) o una combinación del inhibidor de CDK4/6 y EPO (PD0332991 + EPO). El día 17 después del tratamiento se llevan a cabo extracciones de sangre seriadas y hemogramas completos para determinar el número de glóbulos rojos, de las diversas subpoblaciones de leucocitos y de plaquetas. El efecto del tratamiento sobre las plaquetas se muestra en el panel superior izquierdo, los glóbulos rojos (GR) en el panel superior derecho, la hemoglobina (Hb) en el panel inferior izquierdo y el hematocrito (HCT) en el panel inferior derecho. Las barras de error representan +/- EEM.

55

- Figura 2A:** La inhibición de CDK4/6 induce una parada en G1 en células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano. Histogramas representativos del análisis del ciclo celular de células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano tratadas con concentraciones variables de PD0332991 durante 16 horas. Las células se recogieron, se fijaron, se tiñeron y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se ajustaron mediante el software Mod-Fit™ de Verity (Verity Software House, Topsham, Maine, Estados Unidos). Unas concentraciones crecientes del inhibidor de CDK4/6 producen una parada "limpia" en G1, sin evidencia de citotoxicidad.
- Figura 2B:** La inhibición de CDK4/6 induce una parada en G1 en células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano. Análisis del ciclo celular de células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano tratadas con concentraciones variables de PD0332991 durante 16 horas. Las células se recogieron, se fijaron, se tiñeron y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se ajustaron mediante el software Mod-Fit™ de Verity (Verity Software House, Topsham, Maine, Estados Unidos). En el gráfico se muestran los correspondientes % de células en G1 (rombos), G2/M (cuadrados) y S (triángulos).
- Figura 3:** La inhibición de CDK4/6 bloquea la proliferación de las células primarias del epitelio tubular proximal de riñón humano. Las células se trataron con concentraciones variables de PD0332991 durante 72 horas. La proliferación celular se cuantificó después de la incubación con CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Los datos representan la media de cuatro réplicas (unidades lumínicas relativas, ULR) +/- la desviación estándar.
- Figura 4:** La inhibición de CDK4/6 anula el daño en el ADN inducido por etopósido en células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano. Las células se pretrataron con concentraciones variables de PD0332991 durante 16 horas y después con etopósido (Etop) durante 8 horas. Las células se recogieron, se fijaron y se tiñeron con anti- γ H2AX-FITC y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se analizaron mediante el software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, Oregon, Estados Unidos). El % de células positivas para γ H2AX se muestra en el gráfico acompañante.
- Figura 5:** La inhibición de CDK4/6 protege las células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano frente a la muerte celular inducida por etopósido. PD0332991 inhibe la citotoxicidad inducida por la quimioterapia de manera dependiente de CDK4/6. Las células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano se incubaron con PD0332991 30 nM o 100 nM durante 16 horas. Se añadió etopósido (Etop 2,5 μ M) durante 8 horas. Después de la incubación, el medio se substituyó por medio fresco y las células se incubaron durante 7 días más. La proliferación celular se evaluó el día 7 con CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Las barras de error indican +/- la desviación estándar.
- Figura 6:** La inhibición de CDK4/6 bloquea la incorporación de EdU en el riñón entero de ratones tratados con cisplatino. Los ratones se trataron con PD0332991 (150 mg/kg) administrado por vía oral una hora antes de la inyección intraperitoneal (IP) de cisplatino (10 mg/kg). Se administró EdU (100 μ g/ratón) por vía IP 24 horas antes del sacrificio. Se extirparon los riñones y se prepararon aislamientos de células individuales que se tiñeron para determinar la incorporación de EdU. La proliferación se evaluó por citometría de flujo. Los datos representan el % de tinción de EdU en células sin tratar, células tratadas con cisplatino y células tratadas con cisplatino y PD0332991.
- Figura 7:** La inhibición de CDK4/6 protege la función renal en ratones tratados con cisplatino. Se trataron cohortes de ratones con cisplatino (10 mg/kg, IP) solamente (cuadrados), PD0332991 (150 mg/kg, por vía oral) solamente (rombos) o inmediatamente antes del cisplatino (10 mg/kg) (triángulos). La función renal se midió el día 7 por cuantificación del nitrógeno ureico sanguíneo (NUS) en mg/dl y la creatinina sérica (Cr suero) en mg/dl. Los datos representan la media de seis animales por cohorte +/- el error estándar de la media.
- Figura 8:** La inhibición de CDK4/6 potencia la proliferación de células deficientes en RB. Líneas celulares de cáncer de pulmón microcítico nulas para RB (H69, H82, H209, H345) o con RB intacta (H417) se incubaron con PD0332991 durante 24 horas. Después de la incubación, se substituyó el medio y las células se cultivaron durante siete días. La proliferación celular se evaluó por medio del reactivo WST-1. Cada punto de datos representa la media de cuatro réplicas +/- EEM. La inhibición de CDK4/6 aumenta la proliferación celular de las líneas celulares deficientes en RB.
- Figura 9:** La inhibición de CDK4/6 potencia la eficacia de la quimioterapia en un modelo de ratón de cáncer de mama deficiente en RB. Se trataron ratones cada siete días durante tres semanas con PD0332991 (150 mg/kg por vía oral) solamente, carboplatino (90 mg/kg IP) solamente o en combinación con PD0332991 (carboplatino + PD0332991). Los datos son el % de variación del volumen tumoral y representan la media de al menos 15 animales

por cohorte +/- EEM.

Figura 10: La inhibición de CDK4/6 potencia la eficacia de la quimioterapia en un modelo de ratón de cáncer de mama deficiente en RB. Se trataron ratones cada siete días durante tres semanas con carboplatino (90 mg/kg IP) solamente (cuadrados oscuros) o en combinación con PD0332991 (150 mg/kg por vía oral; cuadrados claros). Los datos son el % de variación del volumen tumoral y representan la media de al menos 15 animales por cohorte +/- EEM.

Figura 11A: La inhibición aguda de CDK4/6 inhibe selectivamente la proliferación homeostática de linfocitos T de memoria. Los ratones se trataron con PD0332991 (150 mg/kg por vía oral). La proliferación de los linfocitos T se evaluó mediante BrdU y citometría de flujo.

Figura 11B: Muestra gráficos de los datos de proliferación de linfocitos T mostrados en la figura 11A.

Figura 11C: La inhibición aguda de CDK4/6 inhibe selectivamente la formación de centros germinales en ratones. Los ratones se trataron con PD0332991 (150 mg/kg por vía oral). La formación de centros germinales se evaluó mediante inmunohistoquímica con Ki67.

Figura 12: Los inhibidores de CDK4/6 como inmunodepresores humanos. Diseño experimental para probar los inhibidores de CDK4/6 como inmunodepresores humanos.

Figura 13: Los inhibidores de CDK4/6 inhiben la proliferación de linfocitos T tras su estimulación a través de la ruta de los receptores de linfocitos T (TCR) en ambos compartimentos, de memoria y virgen. Se purificaron linfocitos T de sangre periférica humana mediante el separador Automacs por selección positiva con CD3 antes de su tratamiento con los inhibidores de CDK4/6 y se estimularon con PMA e ionomicina durante 48 horas. La proliferación de los linfocitos T de memoria (CD45RA+) o virgen (CD45RA-) después de la estimulación con PMA e ionomicina se midió mediante tinción FACS de las células BrdU+ o Ki67+. Se muestran los porcentajes de inhibición, que indican mayor inhibición del compartimento de memoria que del compartimento virgen.

Figura 14: Los inhibidores de CDK4/6 inhiben la proliferación de linfocitos T tras su estimulación a través de la ruta de los TCR. Los linfocitos T tienen una proliferación más activa después de su estimulación a través de la ruta de los TCR, que se anula por la inhibición de CDK4/6. Una inhibición similar se observó también en el compartimento de CD8+. La proliferación se determinó por la incorporación de BrdU o Ki67. LD4 = 2BrlC, las barras de error indican +/- EEM.

Figura 15: Cambios en la composición de los linfocitos T CD4 después de la inhibición de CDK4/6. Los inhibidores de CDK4/6 inhiben la proliferación de linfocitos T tras su estimulación a través de la ruta de los TCR. Se muestran los linfocitos T de memoria centrales (CCR7- CD45RA-), efectores (CCR7+ CD45RA+), vírgenes (CCR7+ CD45RA+) y terminalmente diferenciados (CCR7- CD45RA+). Las fracciones de linfocitos T de memoria y terminalmente diferenciados, según se determinan por la incorporación de BrdU, se reducen después de la inhibición de CDK4/6. LD4 = 2BrlC. Resultados similares en el compartimento de CD8+.

Figura 16: Cambios en la composición de los linfocitos T CD4 después de la inhibición de CDK4/6. Los inhibidores de CDK4/6 inhiben la proliferación de linfocitos T tras su estimulación a través de la ruta de los TCR. Se muestran los linfocitos T de memoria centrales (CCR7- CD45RA-), efectores (CCR7+ CD45RA+), vírgenes (CCR7+ CD45RA+) y terminalmente diferenciados (CCR7- CD45RA+). Las fracciones de linfocitos T de memoria y terminalmente diferenciados, según se determinan por la incorporación de Ki67, se reducen después de la inhibición de CDK4/6. LD4 = 2BrlC.

Figura 17A: Inhibición preferente de la proliferación de los linfocitos T de memoria y TD en linfocitos T CD4+. Se muestran los linfocitos T de memoria centrales (CCR7- CD45RA-), efectores (CCR7+ CD45RA+), vírgenes (CCR7+ CD45RA+) y terminalmente diferenciados (CCR7- CD45RA+). Diagramas de puntos representativos del flujo con el tratamiento indicado: vehículo (DMSO), PD0332991 o 2BrlC.

Figura 17B: Inhibición preferente de la proliferación de los linfocitos T de memoria y TD en linfocitos T CD4+. El gráfico muestra la relación entre los linfocitos T de memoria y los linfocitos T vírgenes para los datos mostrados en la figura 17A. Las fracciones de linfocitos T de memoria y terminalmente diferenciados se reducen después de la inhibición de CDK4/6. LD4 = 2BrlC. Las barras de error indican +/- EEM.

Figura 17C: Inhibición preferente de la proliferación de los linfocitos T de memoria y TD en linfocitos T CD4+. El gráfico cuantifica el % de linfocitos T para los datos mostrados en la figura 17A. Las fracciones de linfocitos T de memoria y terminalmente diferenciados se reducen después de la inhibición de CDK4/6. Las barras de error indican +/- EEM.

5

Figura 18: Inhibición preferente de la proliferación de los linfocitos T de memoria y TD en linfocitos T CD8+. Se muestran los linfocitos T de memoria centrales (CCR7- CD45RA-), efectores (CCR7+ CD45RA+), vírgenes (CCR7+ CD45RA+) y terminalmente diferenciados (CCR7- CD45RA+). Las fracciones de linfocitos T de memoria y terminalmente diferenciados se reducen después de la inhibición de CDK4/6. L4D = 2BrIC.

10

Figura 19: Inhibición preferente de la proliferación de los linfocitos T de memoria y TD. Los inhibidores de CDK4/6 inhiben la activación de los linfocitos T por PMA e ionomicina. Se estimularon linfocitos T de sangre periférica humana con PMA e ionomicina con o sin tratamiento con inhibidores de CDK4/6. La fracción de linfocitos T activados (CD25+) tras la estimulación se midió mediante FACS. Se observó que la activación de los linfocitos T disminuía después del tratamiento con los inhibidores de CDK4/6. LD4 = 2BrIC.

15

Figura 20: Los inhibidores de CDK4/6 inhiben la proliferación de linfocitos B después de su estimulación a través de receptores de linfocitos B (BCR). Los linfocitos B se purificaron por selección mediante Automacs de los linfocitos CD19+. Se determinó la incorporación de BrdU en linfocitos B periféricos humanos purificados después de su estimulación con anti-IgM con o sin tratamiento con inhibidores de CDK4/6. La fracción de linfocitos B proliferantes disminuyó 10 veces después de la inhibición con L4D. L4D = 2BrIC.

20

Figura 21: La inhibición de CDK4/6 bloquea la proliferación de los linfocitos T y B. Los animales se trataron con el inhibidor de CDK4/6 (PD0332991, barras blancas) o vehículo (barras negras) durante 24 horas y después se sacrificaron. Se aislaron los esplenocitos, que se tiñeron para detectar marcadores de linfocitos B y T. Después de seleccionar las poblaciones adecuadas se llevó a cabo una tinción con Ki67 como indicador de proliferación y de la fase S. Las barras de error indican +/- EEM.

25

Figura 22: Los inhibidores de CDK4/6 bloquean la proliferación de los linfocitos B. Los animales se trataron con el inhibidor de CDK4/6 (150 mg/kg, en administración diaria por vía oral) o vehículo durante cuatro días y con BrdU en el agua de beber durante tres días. Después del tratamiento con BrdU, los animales se sacrificaron. Se aislaron los esplenocitos, que se tiñeron para detectar marcadores de linfocitos B. Después de seleccionar las poblaciones adecuadas se llevó a cabo una tinción con BrdU como indicador de proliferación.

30

Figura 23: Los inhibidores de CDK4/6 bloquean la timopoyesis. Los animales se trataron con el inhibidor de CDK4/6 (150 mg/kg, en administración diaria por vía oral) o vehículo durante cuatro días y entonces se evaluó el número de timocitos por citometría de flujo con la detección de células doblemente negativas (DN: CD4- CD8-), doblemente positivas (DP: CD4+ CD8+) o células simplemente positivas (SP) para CD4 o CD8. La inhibición de CDK4/6 produjo una disminución pronunciada de la producción de nuevas células DP, con efectos moderados en las fracciones de células DN y SP

35

40

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0014] La materia presentemente desvelada se describirá más detalladamente a continuación, con referencia a los ejemplos acompañantes, en los que se muestran realizaciones representativas. Sin embargo, la materia presentemente desvelada puede realizarse de formas diferentes y no debe interpretarse como limitada por las realizaciones expuestas en este documento. Más bien, se proporcionan estas realizaciones para que la descripción sea minuciosa y completa y transmita plenamente el alcance de las realizaciones a los expertos en la técnica.

45

[0015] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que corresponde la materia presentemente descrita.

50

[0016] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, una fórmula química o nombre dados abarcan todos los isómeros ópticamente activos y estereoisómeros, así como las mezclas racémicas, en caso de que dichos isómeros y mezclas existan.

55

I. Definiciones

[0017] Aunque se piensa que un experto en la técnica entiende bien los términos siguientes, se exponen las definiciones siguientes para facilitar la explicación de la materia presentemente desvelada.

[0018] Siguiendo una convención tradicional de la ley de patentes, los términos “un”, “uno/a” y “el/la” se refieren a “uno o más” cuando se usan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones. Así por ejemplo, la referencia a “un compuesto” o “una célula” incluye una pluralidad de tales compuestos o células, etc.

[0019] El término “comprende”, que es sinónimo de “incluye”, “contiene” o “caracterizado por” es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas de procedimiento adicionales no enumerados. “Comprende” es un término de la técnica usado en el lenguaje de las reivindicaciones que significa que los elementos mencionados son esenciales, pero que pueden añadirse otros elementos y formar aún una construcción dentro del alcance de la reivindicación.

[0020] Según se usa en este documento, la expresión “consta de” excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando la expresión “consta de” aparece en una cláusula del cuerpo de una reivindicación, más bien que inmediatamente después del preámbulo, solamente limita el elemento expuesto en esa cláusula; otros elementos no se excluyen de la reivindicación en general.

[0021] Según se usa en este documento, la expresión “consta esencialmente de” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados, más aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas del objeto reivindicado.

[0022] Con respecto a los términos “comprende”, “consta de” y “consta esencialmente de”, cuando uno de los tres términos se usa en este documento, la materia presentemente desvelada y reivindicada puede incluir el uso de cualquiera de los otros dos términos.

[0023] El término “y/o”, cuando se usa para describir dos elementos o condiciones, por ejemplo, CDK4 y/o CDK6, se refiere a situaciones en las que ambos elementos o condiciones están presentes o son aplicables y a situaciones en las que solo uno de los elementos o condiciones está presente o es aplicable. Por lo tanto, un inhibidor de CDK4 y/o CDK6 puede ser un compuesto que inhibe CDK4 y CDK6, un compuesto que inhibe solo CDK4 o un compuesto que inhibe solo CDK6.

[0024] Por “célula sana” o “célula normal” se indica cualquier célula en un sujeto que no muestra características, síntomas y/o marcadores de una enfermedad (tal como, pero sin limitarse a cáncer u otra enfermedad proliferativa). En algunas realizaciones, la célula sana es una célula madre. En algunas realizaciones, la célula sana es una célula madre o progenitora hematopoyética (HSPC). Las células progenitoras incluyen, pero no se limitan a células madre hematopoyéticas a largo plazo (LT-HSC), células madre hematopoyéticas a corto plazo (ST-HSC), progenitores multipotentes (MPP), progenitores mieloides comunes (CMP), progenitores linfoides comunes (CLP), progenitores de granulocitos y monocitos (GMP) y progenitores de megacariocitos y eritrocitos (MEP). Las células progenitoras también incluyen células efectoras maduras derivadas de células madre hematopoyéticas, incluidos, pero sin limitarse a eritrocitos, plaquetas, granulocitos, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B.

[0025] En algunas realizaciones, la célula sana es una célula en un tejido no hematopoyético, tal como, pero sin limitarse al hígado, riñón, páncreas, cerebro, pulmón, glándulas suprarrenales, intestino, estómago, piel, sistema auditivo, huesos, vejiga, ovarios, útero, testículos, vesícula biliar, tiroides, corazón, islotes pancreáticos, vasos sanguíneos y similares.

[0026] Por “agentes que dañan el ADN” se entienden en este documento compuestos químicos que dañan el ADN y otros efectores de daño para el ADN (por ejemplo, radiación ionizante). Por lo tanto, un agente que daña el ADN puede incluir un tratamiento quimioterapéutico y de radiación proporcionado para un fin concreto, tal como, pero sin limitarse a un fin médico (por ejemplo, para tratar el cáncer u otras enfermedades relacionadas con la hiperproliferación celular). Los agentes que dañan el ADN pueden referirse también a la exposición accidental a compuestos químicos y/o otros agentes que dañan el ADN que puede tener lugar, por ejemplo, debido a una exposición ambiental inesperada (por ejemplo, en el puesto de trabajo o en otro ambiente, debido, por ejemplo, a un vertido químico, el desecho inapropiado u otro manejo inapropiado de residuos químicos o radiológicos, un fallo de las medidas de seguridad y/o del equipo de seguridad personal durante el uso de compuestos químicos que dañan el ADN o radiación, un ataque terrorista, guerra o un accidente en una planta industrial y/o de energía nuclear).

[0027] Según se usa en este documento, el término “radiación ionizante” se refiere a radiación de energía suficiente que, cuando es absorbida por células y tejidos, típicamente induce la formación de especies reactivas de oxígeno y daño en el ADN. La radiación ionizante puede incluir rayos X, rayos γ y el bombardeo de partículas (por ejemplo, haces de neutrones, haces de electrones, protones, mesones y otros) y se usa para fines que incluyen, pero no se limitan a pruebas y tratamientos médicos, fines científicos, pruebas industriales, fabricación y esterilización, así como para armas y el desarrollo de armas. generalmente, la radiación se mide en unidades de dosis absorbida, como rad o gray (Gy) o en unidades de dosis equivalente, como rem o sievert (Sv).

[0028] El término “cáncer”, según se usa en este documento, se refiere a enfermedades causadas por la división celular incontrolada y la capacidad de las células para producir metástasis o establecer nuevos crecimientos en sitios adicionales. Los términos “maligno”, “neoplasia”, “tumor” y variaciones de los mismos se refieren a células cancerosas o grupos de células cancerosas.

[0029] Algunos tipos específicos de cáncer incluyen, pero no se limitan a cánceres de piel, cánceres del tejido conectivo, cánceres adiposos, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres pancreáticos, cánceres ováricos, cánceres cervicales, cánceres uterinos, cánceres anogenitales, cánceres de riñón, cánceres de vejiga, cánceres de colon, cánceres de próstata, cánceres de cabeza y cuello, cánceres cerebrales, cánceres del sistema nervioso central (SNC), cánceres de retina, cánceres sanguíneos y linfáticos.

[0030] En algunas realizaciones, el término cáncer se refiere a un cáncer que puede caracterizarse por (por ejemplo, que tiene células que muestran) un aumento del nivel de actividad de CDK2 o una reducción de la expresión de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma o de proteínas de la familia del retinoblastoma, tales como, pero sin limitarse a p107 y p130. El aumento del nivel de actividad de CDK2 o la reducción de la expresión de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma o de proteínas de la familia del retinoblastoma pueden ser, por ejemplo, con respecto a las células normales.

[0031] En algunas realizaciones, el aumento del nivel de actividad de CDK2 puede estar asociado con (por ejemplo, puede resultar de u observarse junto con) la amplificación o sobreexpresión del protooncogén MYC. En algunas realizaciones, el aumento del nivel de actividad de CDK2 puede estar asociado con la sobreexpresión de la ciclina E1, la ciclina E2 o la ciclina A.

[0032] Según se usa en este documento, el término “quimioterapia” se refiere al tratamiento con un compuesto citotóxico (tal como, pero sin limitarse a un compuesto que daña el ADN) para reducir o eliminar el crecimiento o la proliferación de células no deseables, tales como, pero sin limitarse a células cancerosas. Por consiguiente, según se usa en este documento, un “compuesto quimioterapéutico” se refiere a un compuesto citotóxico usado para el tratamiento del cáncer. El efecto citotóxico del compuesto puede ser, pero no necesariamente, el resultado de uno o más de entre la intercalación o la unión a ácidos nucleicos, la alquilación de ADN o ARN, la inhibición de la síntesis de ARN o ADN, la inhibición de otra actividad relacionada con los ácidos nucleicos (por ejemplo, la síntesis de proteínas) o cualquier otro efecto citotóxico.

[0033] Por lo tanto, un “compuesto citotóxico” puede ser cualquier compuesto o cualquier combinación de compuestos también descritos como agentes “antineoplásicos” o agentes “quimioterapéuticos”. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a compuestos que dañan el ADN y otros compuestos que pueden destruir células. Los “compuestos que dañan el ADN” incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes, intercalantes de ADN, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de ADN o ARN, análogos de bases de ADN, inhibidores de topoisomerasa e inhibidores de telomerasa o compuestos de unión a ADN telomérico. Por ejemplo, los agentes alquilantes incluyen alquilsulfonatos, como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, como benzodepa, carbocouona, meturedpa y uredepa; etileniminas y metilmelaminas como altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolmelamina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; y nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina.

[0034] Los antibióticos usados en el tratamiento del cáncer incluyen dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, sulfato de bleomicina, mitomicina, plicamicina, y estreptozocina. Los antimetabolitos quimioterapéuticos incluyen mercaptopurina, tioguanina, cladribina, fosfato de fludarabina, fluorouracilo (5-FU), floxuridina, citarabina, pentostatina, metotrexato y azatioprina, aciclovir, β -1-D-arabinósido de adenina, ametopterina, aminopterina, 2-aminopurina, afidicolina, 8-azaguanina, azaserina, 6-azauracilo, 2'-azido-2'-desoxinucleósidos, 5-bromodesoxicidina, β -1-D-arabinósido de citosina, diazoxinorleucina, didesoxinucleósidos, 5-fluorodesoxicidina,

5-fluorodesoxiuridina e hidroxiurea.

[0035] Los inhibidores quimioterapéuticos de la síntesis de proteínas incluyen abrina, ácido aurintricarboxílico, cloranfenicol, colicina E3, cicloheximida, toxina diftérica, edeína A, emetina, eritromicina, etionina, fluoruro, 5-fluorotriptófano, ácido fusídico, metilendifosfonato de guanililo e imidodifosfonato de guanililo, kanamicina, kasugamicina, kirromicina y o-metiltreonina. Otros inhibidores de la síntesis de proteínas incluyen modicina, neomicina, norvalina, pactamicina, paromomicina, puromicina, ricina, toxina de Shiga, showdomicina, esparsomicina, espectinomicina, estreptomycin, tetraciclina, tioestreptona y trimetoprima. Los inhibidores de la síntesis de ADN incluyen agentes alquilantes como sulfato de dimetilo, mitomicina C, mostazas de nitrógeno y azufre; agentes intercalantes como colorantes de acridina, actinomycinas, adriamicina, antracenos, benzopireno, bromuro de etidio, intercalante de diioduro de propidio; y otros agentes como distamicina y netropsina. También pueden usarse como el compuesto que daña el ADN inhibidores de topoisomerasa como cumermicina, ácido nalidixico, novobiocina y ácido oxolínico; inhibidores de la división celular, incluidas colcemida, colchicina, vimblastina y vincristina; e inhibidores de la síntesis de ARN, incluidas actinomycin D, α -amantina y otras amatoxinas fúngicas, cordicepina (3'-desoxiadenosina), diclororribofuranosilbencimidazol, rifampicina, estreptovaricina y estreptolidigina.

[0036] Por lo tanto, los actuales compuestos quimioterapéuticos cuyos efectos tóxicos pueden mitigarse mediante los inhibidores selectivos de CDK4/6 presentemente desvelados incluyen, pero no se limitan a adrimicina, 5-fluorouracilo (5-FU), etopósido, camptotecina, actinomycin D, mitomicina, cisplatino, peróxido de hidrógeno, carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfano, nitrosourea, dactinomycin, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicomicina, tamoxifeno, taxol, transplatino, vimblastina, metotraxato y similares.

[0037] Con "agente reductor de la toxicidad" se indica un compuesto u otro agente que se usa para reducir los efectos citotóxicos de un agente que daña el ADN. El agente reductor de la toxicidad es un agente que puede prevenir o reducir el daño al ADN en una célula, tejido o sujeto tratado con un agente que daña el ADN o expuesto de otro modo al mismo. La prevención o reducción del daño al ADN efectuada por el agente reductor de la toxicidad puede afectar a ciertas células (por ejemplo, ciertas células sanas) en un sujeto, mientras no ejerce ningún efecto en otras células (por ejemplo, en células enfermas y/o tumorales) del sujeto. Por lo tanto, el uso del agente reductor de la toxicidad puede proteger ciertas células en un sujeto con el fin de permitir una dosis más frecuente o más alta de los agentes que dañan el ADN durante un régimen de tratamiento de una enfermedad. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad reduce la citotoxicidad no deseada debida al uso de un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad puede reducir la citotoxicidad no deseada resultante de radiación.

[0038] El agente reductor de la toxicidad es un factor de crecimiento. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad se selecciona del grupo que comprende, pero no se limita a un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un G-CSF pegilado, un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), trombopoyetina, eritropoyetina, eritropoyetina pegilada, interleucina (IL) 12, el factor acero y un factor de crecimiento de queratinocitos. "Aumentar la eficacia de un agente reductor de la toxicidad" se refiere a la capacidad de un inhibidor selectivo de CDK4 y/o CDK6 de aumentar la eficacia de un agente reductor de la toxicidad. Por lo tanto, el término puede referirse al uso beneficioso de la combinación de un agente reductor de la toxicidad y un inhibidor selectivo de CDK4 y/o CDK6. Por ejemplo, el uso de la combinación puede resultar en una mayor tolerancia del sujeto a una cantidad dada o a una frecuencia de administración dada de un agente que daña el ADN con respecto a la tolerancia que el sujeto hubiera tenido si se le hubiera administrado solamente el agente reductor de la toxicidad (o el inhibidor selectivo de CDK4 y/o CDK6). El uso de la combinación también puede ofrecer protección frente a una gama más amplia de efectos secundarios debidos a la exposición al agente que daña el ADN y/o protección en una mayor diversidad de tipos de células y/o tejidos en el sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un inhibidor selectivo de CDK4 y/o CDK6 puede proporcionar efectos sinérgicos al usarlo en combinación con un factor de crecimiento para el rescate y apoyo de las diversas poblaciones hematopoyéticas frente a un agente que daña el ADN.

[0039] Con "cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto" se indica una cantidad eficaz para proporcionar un resultado beneficioso en el sujeto. Por ejemplo, puede ser la cantidad eficaz para reducir o eliminar la toxicidad asociada con el agente que daña el ADN (por ejemplo, la quimioterapia u otra exposición a un compuesto citotóxico en HSPC sanas del sujeto o a RI). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es la cantidad requerida para inhibir temporalmente (por ejemplo por unas pocas horas o días) la proliferación de las células madre hematopoyéticas (es decir, para inducir un estado quiescente en las células madre hematopoyéticas) en el sujeto.

- [0040]** En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe selectivamente CDK4 y/o CDK6 no tiene efectos fuera de la diana. “No tiene” puede referirse a un inhibidor selectivo de CDK4/6 que no tiene un efecto no deseado fuera de la diana, en particular, cuando se usa *in vivo* o se evalúa por medio de un ensayo a base de células. Por lo tanto, “no tiene” puede referirse a un inhibidor selectivo de CDK4/6 que no tiene efectos fuera de la diana tales como, pero sin limitarse a toxicidad a largo plazo, efectos antioxidantes, efectos estrógenos, efectos inhibidores de tirosina-cinasas, efectos inhibidores sobre otras CDK distintas de CDK4/6; y/o paradas del ciclo celular en células independientes de CDK4/6.
- [0041]** Un inhibidor selectivo de CDK4/6 que “sustancialmente no tiene” efectos fuera de la diana es un inhibidor de CDK4/6 que puede tener efectos de menor importancia fuera de la diana, que no interfieren con la capacidad del inhibidor de ofrecer protección frente a compuestos citotóxicos en células dependientes de CDK4/6. Por ejemplo, un inhibidor de CDK4/6 que “sustancialmente no tiene” efectos fuera de la diana puede tener efectos de menor importancia sobre otras CDK (por ejemplo, con CI_{50} para CDK1 o CDK2 que son $> 0,5 \mu M$, $> 1,0 \mu M$ o $> 5,0 \mu M$), siempre que el inhibidor produzca una parada en G1 selectiva en las células dependientes de CDK4/6.
- [0042]** Con “reducido” o “prevenido” o sus variaciones gramaticales se indica, respectivamente, la disminución de los efectos o la evitación de que se produzcan efectos en absoluto. “Mitigar” puede referirse a reducir y/o prevenir.
- [0043]** Con “quiescencia farmacológica” se indica una parada temporal del ciclo celular.
- [0044]** “Con riesgo de padecer una enfermedad autoinmunitaria” se refiere a un sujeto del que se sospecha que tiene probabilidad de padecer una enfermedad autoinmunitaria por razones que incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a tener uno o más marcadores genéticos asociados con una enfermedad autoinmunitaria, tener antecedentes familiares de enfermedades autoinmunitarias y/o haber estado expuesto a un agente ambiental del que se sospecha que provoca la aparición de una enfermedad autoinmunitaria. La expresión puede aplicarse también a sujetos a los que se ha diagnosticado una enfermedad autoinmunitaria con anterioridad pero que están en remisión y/o actualmente no presentan síntomas.
- [0045]** En algunas realizaciones, el sujeto tratado en la materia presentemente desvelada es deseablemente un sujeto humano, aunque ha de entenderse que los procedimientos descritos en este documento son eficaces en relación con todas las especies de vertebrados (por ejemplo, mamíferos, aves, etc.), las cuales se pretende incluir en el término “sujeto”.
- [0046]** Más en particular, en este documento se proporciona el tratamiento de mamíferos tales como humanos, así como aquellos mamíferos de importancia debido a estar en peligro de extinción (como los tigres siberianos), de importancia económica (animales criados en granjas para el consumo humano) y/o importancia social (animales de compañía o en zoológicos) para los humanos, por ejemplo, otros carnívoros distintos de los humanos (como perros y gatos), animales porcinos (cerdos y jabalíes), rumiantes (como las vacas, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camellos) y caballos. Por lo tanto, las realizaciones de los procedimientos descritos en este documento incluyen el tratamiento de ganado, incluido, pero sin limitarse a animales porcinos domesticados (cerdos), rumiantes, caballos y similares.
- [0047]** Según se usa en este documento, el término “alquilo” se refiere a cadenas de hidrocarburo C_{1-20} , incluidas cadenas lineales (es decir, “cadenas rectas”), ramificadas o cíclicas, saturadas o al menos parcialmente y en algunos casos totalmente insaturadas (es decir, alqueno y alquino) que incluyen, por ejemplo, grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *tert*-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y alenilo. “Ramificado” se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena de alquilo lineal. “Alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo con 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C_{1-8}), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono. “Alquilo superior” se refiere a un grupo alquilo con de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, “alquilo” se refiere en particular a cadenas lineales de alquilo C_{1-8} . En otras realizaciones, “alquilo” se refiere en particular a cadenas ramificadas de alquilo C_{1-8} .
- [0048]** Opcionalmente, los grupos alquilo pueden estar sustituidos (un “alquilo sustituido”) con uno o más sustituyentes de grupos alquilo que pueden ser iguales o diferentes. El término “sustituyente de grupo alquilo” incluye, pero no se limita a alquilo, alquilo sustituido, halo, arilamino, acilo, hidroxilo, ariloxilo, alcoxilo, alquiltio, ariltio, aralquilo, aralquiltio, carboxilo, alcoxycarbonilo, oxo y cicloalquilo. Opcionalmente, en la cadena de alquilo puede

haber insertados uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o sin sustituir, en que el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (también denominado en este documento “alquilaminoalquilo”) o arilo.

[0049] Por lo tanto, según se usa en este documento, el término “alquilo sustituido” incluye grupos alquilo, según se definen en este documento, en los que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo alquilo se reemplazan por otro átomo o grupo funcional, incluidos, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

[0050] El término “arilo” se usa en este documento para referirse a una fracción aromática que puede ser un solo anillo aromático o anillos aromáticos múltiples fusionados entre sí, enlazados covalentemente o enlazados a un grupo común como, pero sin limitarse a una fracción de metileno o etileno. El grupo enlazante común puede ser también un carbonilo como en benzofenona, oxígeno como en difeniléter o nitrógeno como en difenilamina. El término “arilo” abarca específicamente compuestos aromáticos heterocíclicos. El o los anillos aromáticos pueden comprender fenilo, naftilo, bifenilo, difeniléter, difenilamina y benzofenona, entre otros. En realizaciones concretas, el término “arilo” indica un compuesto aromático cíclico que comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono e incluye anillos de hidrocarburo y anillos aromáticos heterocíclicos de cinco y seis miembros.

[0051] Opcionalmente, el grupo arilo puede estar sustituido (un “arilo sustituido”) con uno o más sustituyentes de grupos arilo que pueden ser iguales, en que el “sustituyente de grupos arilo” incluye alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, aralquilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo aralquioxilo, carboxilo, carbonilo, acilo, halo, nitro, alcoxicarbonilo, ariloxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, aciloxilo, acilamino, aroilamino, carbamoilo, alquilcarbamoilo, dialquilcarbamoilo, ariltio, alquiltio, alquileo y -NR'R”, en que R' y R” puede ser cada uno independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido y aralquilo.

[0052] Por lo tanto, según se usa en este documento, el término “arilo sustituido” incluye grupos arilo, según se definen en este documento, en los que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo arilo se reemplazan por otro átomo o grupo funcional incluidos, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

[0053] Algunos ejemplos específicos de grupos arilo incluyen, pero no se limitan a ciclopentadienilo, fenilo, furano, tiofeno, pirrol, pirano, piridina, imidazol, bencimidazol, isotiazol, isoxazol, pirazol, pirazina, triazina, pirimidina, quinolina, isoquinolina, indol, carbazol y similares.

[0054] El término “heteroarilo” se refiere a grupos arilo en los que al menos un átomo del esqueleto del anillo o los anillos aromáticos es un átomo distinto de carbono. Por lo tanto, los grupos heteroarilo tienen uno o más átomos que no son de carbono seleccionados del grupo que incluye, pero no se limita a nitrógeno, oxígeno y azufre.

[0055] Según se usa en este documento, el término “acilo” se refiere a un grupo de ácido carboxílico orgánico en el que el -OH del grupo carboxilo ha sido reemplazado por otro sustituyente (es decir, según se representa por RCO-, en que R es un grupo alquilo o arilo según se definen en este documento). Como tal, el término “acilo” incluye específicamente grupos arilacilo, tales como un grupo acetilfurano y un grupo fenacilo. Algunos ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo y benzoilo.

[0056] “Cíclico” y “cicloalquilo” se refieren a sistemas de anillos no aromáticos mono o multicíclicos de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de carbono. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente parcialmente insaturado. Además, el grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido con un sustituyente de grupos alquilo según se define en este documento, oxo y/o alquileo. Opcionalmente, en la cadena de cicloalquilo puede haber insertados uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o sin sustituir, en que el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, lo que proporciona un grupo heterocíclico. Algunos anillos de cicloalquilo monocíclicos representativos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo. Los anillos de cicloalquilo multicíclicos incluyen adamantilo, octahidronaftilo, decalina, canfor, canfano y noradamantilo.

[0057] Los términos “heterociclo” o “heterocíclico” se refieren a grupos cicloalquilo (es decir, grupos cíclicos no aromáticos según se describen anteriormente) en los que uno o más de los átomos de carbono del esqueleto de un anillo cíclico está reemplazado por un heteroátomo (por ejemplo, nitrógeno, azufre u oxígeno). Algunos ejemplos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a tetrahidrofurano, tetrahidropirano, morfolina, dioxano, piperidina, piperazina y pirrolidina.

[0058] “Alcoxilo” o “alcoxi” se refieren a un grupo alquilo-O- en el que alquilo es según se describe previamente. El término “alcoxilo”, según se usa en este documento, puede referirse, por ejemplo, a metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, *t*-butoxilo y pentoxilo. El término “oxialquilo” puede usarse de manera
5 intercambiable con “alcoxilo”.

[0059] “Ariloxilo” o “ariloxi” se refieren a un grupo arilo-O- en el que el grupo arilo es según se describe previamente, incluido un arilo sustituido. El término “ariloxilo”, según se usa en este documento, puede referirse a feniloxilo o hexiloxilo y feniloxilo o hexiloxilo sustituidos con alquilo, alquilo sustituido, halo o alcoxilo.

[0060] “Aralquilo” se refiere a un grupo arilalquilo en el que arilo y alquilo son según se describen previamente y que incluye arilo sustituido y alquilo sustituido. Algunos grupos aralquilo ejemplares incluyen bencilo, feniletilo y naftilmetilo.

[0061] “Aralquioxilo” o “aralquioxo” se refieren a un grupo aralquilo-O- en el que el grupo aralquilo es según se describe previamente. Un grupo aralquioxilo ejemplar es benciloxilo.

[0062] El término “amino” se refiere al grupo -NR'R", en el que R' y R" se seleccionan cada uno independientemente del grupo que incluye H y alquilo, cicloalquilo, heterociclo, aralquilo, arilo y heteroalquilo
20 sustituido o sin sustituir. En algunas realizaciones, el grupo amino es -NH₂. “Aminoalquilo” y “aminoarilo” se refieren al grupo -NR'R", en el que R' es según se define anteriormente para amino y R" es alquilo o arilo sustituido o sin sustituir, respectivamente.

[0063] “Acilamino” se refiere a un grupo acilo-NH- en el que acilo es según se describe previamente.

[0064] El término “carbonilo” se refiere a -(C=O)- o a un sustituyente de oxígeno con enlace doble unido a un átomo de carbono de un grupo parental mencionado previamente.

[0065] El término “carboxilo” se refiere al grupo -COOH.

[0066] Los términos “halo”, “haluro” o “halógeno”, según se usan en este documento, se refieren a grupos de
30 flúor, cloro, bromo y yodo.

[0067] Los términos “hidroxilo” e “hidroxi” se refieren al grupo -OH.

[0068] El término “oxo” se refiere a un compuesto descrito anteriormente en este documento en el que un átomo de carbono se reemplaza por un átomo de oxígeno.

[0069] El término “ciano” se refiere al grupo -CN.

[0070] El término “nitro” se refiere al grupo -NO₂.

[0071] El término “tio” se refiere a un compuesto descrito previamente en este documento en el que un átomo de carbono o de oxígeno se reemplaza por un átomo de azufre.

45 II. Compuestos y procedimientos para la protección frente a agentes que dañan el ADN

[0072] Las células madre específicas de tejidos y subconjuntos de otras células proliferantes residentes son capaces de autorrenovación, lo que significa que son capaces de reemplazarse a sí mismas a lo largo de la vida de
50 un mamífero adulto mediante replicación regulada. Adicionalmente, las células madre se dividen asimétricamente para producir células “descendientes” o “progenitoras” que a su vez producen los diversos componentes de un órgano dado. Por ejemplo, en el sistema hematopoyético, las células madre hematopoyéticas dan lugar a células progenitoras que a su vez dan lugar a todos los componentes diferenciados de la sangre (por ejemplo, glóbulos blancos, glóbulos rojos, linfocitos y plaquetas).

[0073] La materia presentemente desvelada se refiere, en parte, a requisitos bioquímicos concretos de las células madre/progenitoras hematopoyéticas tempranas (HSPC) y otras células proliferantes en el mamífero adulto. En particular, se ha encontrado que ciertas células proliferantes específicas, como las HSPC, requieren la actividad enzimática de las cinasas proliferativas cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y/o cinasa dependiente de ciclina 6

(CDK6) para la replicación celular. Por el contrario, la gran mayoría de las células proliferantes en mamíferos adultos no requiere la actividad de CDK4 y/o CDK6 (es decir, CDK4/6). Estas células diferenciadas pueden proliferar en ausencia de actividad de CDK4/6 usando otras cinasas proliferativas, como la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) o la cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1). Por lo tanto, se piensa que el tratamiento de mamíferos con un inhibidor selectivo de CDK4/6 puede conducir a la inhibición de la proliferación (es decir, quiescencia farmacológica) en compartimentos celulares muy restringidos, como el de HSPC. Por ejemplo, el tratamiento transitorio (tal como, pero sin limitarse a un periodo de 48, 24, 20, 16, 12, 10, 8, 6, 4, 2 o 1 horas) con PD0332991, un inhibidor selectivo de CDK4/6, hace quiescentes a las células madre hematopoyéticas y a sus células progenitoras hematopoyéticas asociadas. Se piensa que las células que son quiescentes son más resistentes a los efectos citotóxicos de los agentes que dañan el ADN que las células proliferantes.

[0074] Por consiguiente, la materia presentemente desvelada proporciona una composición farmacéutica para usar en un procedimiento para la protección de mamíferos frente a los efectos tóxicos agudos y crónicos de los compuestos quimioterapéuticos imponiendo un estado quiescente en las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) mediante el tratamiento transitorio (tal como, pero sin limitarse a un periodo inferior a 48, 24, 20, 16, 12, 10, 8, 6, 4, 2 o 1 horas) con un inhibidor selectivo de CDK4/6 no tóxico (tal como, pero sin limitarse a un inhibidor de CDK4/6 no tóxico disponible por vía oral). Durante el periodo de quiescencia, las HSPC del sujeto son más resistentes a ciertos efectos del compuesto quimioterapéutico. Las HSPC se recuperan de este periodo de quiescencia transitoria y funcionan normalmente después de finalizar el tratamiento con el inhibidor. Por lo tanto, el tratamiento con inhibidores selectivos de CDK4/6 puede proporcionar una notable protección de la médula ósea y puede conducir a una recuperación más rápida de los recuentos de células de sangre periférica (hematocrito, plaquetas, linfocitos y células mieloides) después de la quimioterapia y/o la radioterapia.

[0075] La patente de los EE. UU. n.º 6.369.086 de Davis y col. (en adelante, "la patente 086") describe que los inhibidores selectivos de CDK pueden ser útiles para limitar la toxicidad de los agentes citotóxicos y pueden usarse para proteger de la alopecia inducida por la quimioterapia. En particular, la patente 086 describe compuestos de oxindol como inhibidores específicos de CDK2. Una referencia relacionada en una revista especializada (véase Davis y col., Science, 291, 134-137 (2001)) describe que la inhibición de CDK2 produce una parada del ciclo celular, lo que reduce la sensibilidad del epitelio a agentes antitumorales activos en el ciclo celular y puede prevenir la alopecia inducida por la quimioterapia. Sin embargo, esta referencia se retiró posteriormente debido a la falta de reproducibilidad de los resultados. En contraste con estos supuestos efectos protectores de los inhibidores selectivos de CDK2, que se cuestionan por la retirada del artículo de la revista, la materia presentemente desvelada se refiere en algunas realizaciones a la protección de las HSPC y a la protección frente a la toxicidad hemática.

[0076] La capacidad para proteger las células madre/progenitoras es deseable tanto en el tratamiento del cáncer como en la mitigación de los efectos de la exposición accidental a, o la sobredosis de compuestos químicos citotóxicos, radiación u otros agentes que dañan el ADN. Los efectos protectores de los inhibidores selectivos de CDK4/6 pueden proporcionarse al sujeto a través del pretratamiento con el inhibidor (es decir, un tratamiento previo con el inhibidor de CDK4/6 de un sujeto para el que se ha previsto un tratamiento con o que presenta riesgo de exposición a un agente que daña el ADN), el tratamiento simultáneo con el inhibidor de CDK4/6 y el agente que daña el ADN o el posttratamiento con el inhibidor de CDK4/6 (es decir, el tratamiento con el inhibidor de CDK4/6 después de la exposición al agente que daña el ADN). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos presentemente desvelados se refieren al uso de compuestos inhibidores selectivos de CDK4/6 para ofrecer protección a sujetos que reciben o van a recibir un tratamiento con compuestos quimioterapéuticos o radiación y para proteger a sujetos frente a otra exposición a compuestos citotóxicos y/o radiación.

[0077] Según se usa en este documento, el término "compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6" se refiere a un compuesto que inhibe selectivamente al menos uno de CDK4 y CDK6 o cuyo modo de acción predominante es a través de la inhibición de CDK4 y/o CDK6. Por lo tanto, los inhibidores selectivos de CDK4/6 son compuestos que generalmente tienen una concentración inhibitoria del 50 % (CI_{50}) menor para CDK4 y/o CDK6 que para otras cinasas. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 puede tener una CI_{50} para CDK4 o CDK6 que es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces menor que las CI_{50} del compuesto para otras CDK (por ejemplo, CDK1 y CDK2). En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 puede tener una CI_{50} para CDK4 o CDK6 que es al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces menor que las CI_{50} del compuesto para otras CDK. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 puede tener una CI_{50} que es más de 100 veces o más de 1.000 veces menor que las CI_{50} del compuesto para otras CDK. En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 es un compuesto que inhibe selectivamente ambas CDK4 y CDK6. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 no es un compuesto de origen natural (por ejemplo, una isoflavona). En algunas realizaciones, el inhibidor de CDK4/6 es un inhibidor deficiente (por ejemplo, $CI_{50} > 1 \mu M$ *in vitro*) de una o más tirosina-cinasas. En

algunas realizaciones, el inhibidor de CDK4/6 es un inhibidor muy potente de serina y/o treonina-cinasas. En algunas realizaciones, el inhibidor de CDK4/6 es un inhibidor deficiente de CDK1 (por ejemplo, $Cl_{50} > 1 \mu\text{M}$ *in vitro*). En algunas realizaciones, el inhibidor de CDK4/6 se caracteriza por tener una potencia relativa 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor para la inhibición de CDK4 o CDK6 en comparación con CDK1.

5

[0078] En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 es un compuesto que induce selectivamente una parada del ciclo celular en G1 en las células dependientes de CDK4/6. Por lo tanto, cuando se tratan con el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 de acuerdo con los procedimientos presentemente desvelados, el porcentaje de células dependientes de CDK4/6 en la fase G1 aumenta, mientras que el porcentaje de células dependientes de CDK4/6 en la fase G2/M y la fase S disminuye. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 es un compuesto que induce una parada del ciclo celular sustancialmente pura (es decir, "limpia") en G1 en las células dependientes de CDK4/6 (por ejemplo, en que el tratamiento con el inhibidor selectivo de CDK4/6 induce una parada del ciclo celular de manera que la mayoría de las células se detienen en G1 según se define por procedimientos estándar (por ejemplo, tinción con yoduro de propidio u otros) y la población de células en las fases G2/M y S combinada es del 20 %, 15 %, 12 %, 10 %, 8 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos de la población celular total).

[0079] Aunque se ha descrito que la estaurosporina, un inhibidor de cinasas inespecífico, induce indirectamente una parada en G1 en algunos tipos celulares (véase Chen y col., *J. Nat. Cancer Inst.*, 92, 1999-2008 (2000)), los inhibidores selectivos de CDK4/6 pueden inducir de manera directa y selectiva la parada del ciclo celular en G1 en células tales como fracciones específicas de las HSPC para ofrecer quimioprotección y radioprotección con menos toxicidad a largo plazo y sin la necesidad de un tratamiento prolongado (por ejemplo, de 48 horas o más) con el inhibidor antes de la exposición al agente que daña el ADN. En particular, aunque algunos inhibidores de cinasa no selectivos pueden causar una parada del ciclo celular en G1 en algunos tipos celulares al disminuir los niveles proteínicos de CDK4, se piensa que los beneficios de los procedimientos presentemente desvelados, sin limitarse a una teoría, se deben al menos en parte a la capacidad de los inhibidores selectivos de CDK4/6 de inhibir directamente la actividad cinásica de CDK4/6 en las HSPC sin disminuir su concentración celular.

[0080] En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 es un compuesto que sustancialmente no tiene efectos fuera de la diana, en particular relacionados con la inhibición de cinasas distintas de CDK4 y/o CDK6. En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 es un inhibidor deficiente (por ejemplo $Cl_{50} > 1 \mu\text{M}$) de otras CDK distintas de CDK4/6 (por ejemplo, CDK1 y CDK2). En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor de CDK4/6 no induce la parada del ciclo celular en células independientes de CDK4/6. En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 es un inhibidor deficiente (por ejemplo $Cl_{50} > 1 \mu\text{M}$) de tirosina-cinasas. Los efectos no deseados adicionales fuera de la diana incluyen, pero no se limitan a toxicidad a largo plazo, efectos antioxidantes y efectos estrógenos.

[0081] Los efectos antioxidantes pueden determinarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, un compuesto sin efectos antioxidantes significativos es un compuesto que no se combina fácilmente con radicales libres, como radicales de oxígeno. Los efectos antioxidantes de un compuesto pueden compararse con los de un compuesto con una actividad antioxidante conocida, como genisteína. Por lo tanto, un compuesto sin actividad antioxidante significativa puede ser uno que tiene aproximadamente 2, 3, 5, 10, 30 o 100 veces menos actividad antioxidante que la genisteína. Las actividades estrógenas pueden determinarse también por medio de ensayos conocidos. Por ejemplo, un compuesto no estrógeno es uno de no se une ni activa significativamente el receptor de estrógeno. Un compuesto que carece sustancialmente de efectos estrógenos puede ser uno que tiene aproximadamente 2, 3, 5, 10, 20 o 100 veces menos actividad estrógena que un compuesto con actividad estrógena, por ejemplo, genisteína.

[0082] Los inhibidores selectivos de CDK4/6 que pueden usarse de acuerdo con los procedimientos presentemente desvelados incluyen cualquier molécula pequeña conocida (por ejemplo, $< 1.000 \text{ Da}$, $< 750 \text{ Da}$ o $< 500 \text{ Da}$) inhibidora selectiva de CDK4/6 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En algunas realizaciones, el inhibidor es un compuesto que no es de origen natural (es decir, un compuesto que no se encuentra en la naturaleza). Se han descrito varias clases de compuestos químicos con capacidad de inhibición de CDK4/6 (por ejemplo, en ensayos acelulares). Los inhibidores selectivos de CDK4/6 útiles en la invención presentemente desvelada pueden incluir, pero no se limitan a pirido[2,3-d]pirimidinas, (por ejemplo, pirido[2,3-d]pirimidin-7-onas y 2-amino-6-cianopirido[2,3-d]pirimidin-4-onas), triaminopirimidinas, aril[a]pirrol[3,4-d]carbazoles, ureas sustituidas con heteroarilo que contiene nitrógeno, 5-pirimidinil-2-aminotiazoles, benzotiadiazinas, acridinonas e isoquinolonas.

[0083] En algunas realizaciones, la pirido[2,3-d]pirimidina es una pirido[2,3-d]pirimidinona. En algunas

realizaciones, la pirido[2,3-d]pirimidinona es pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. En algunas realizaciones, la pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona está sustituida con un grupo aminoarilo o aminoheteroarilo. En algunas realizaciones, la pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona está sustituida con un grupo aminopiridina. En algunas realizaciones, la pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona es una 2-(2-piridinil)aminopirido[2,3-d]pirimidin-7-ona. Por ejemplo, el compuesto pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona puede tener la estructura de la fórmula (II) según se describe en la publicación de patente de los EE. UU. n.º 2007/0179118 de Barvian y col.

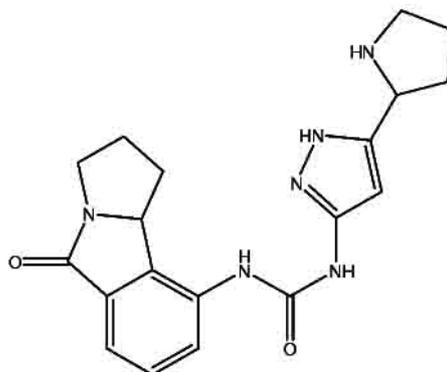
[0084] En algunas realizaciones, el compuesto pirido[2,3-d]pirimidina es 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-ilpiridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (es decir, PD0332991) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Véase Toogood y col., J. Med. Chem., 2005, 48, 2388-2406.

[0085] En algunas realizaciones, la pirido[2,3-d]pirimidinona es una 2-amino-6-cianopirido[2,3-d]pirimidin-4-ona. Por ejemplo, Tu y col. describen inhibidores selectivos de CDK4/6 que comprenden 2-amino-6-cianopirido[2,3-d]pirimidin-4-ona. Véase Tu y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16, 3578-3581.

[0086] Según se usa en este documento, "triaminopirimidinas" son compuestos de pirimidina en los que al menos tres carbonos en el anillo de pirimidina están sustituidos con grupos de la fórmula -NR₁R₂, en que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consta de H, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo y heteroarilo. Cada uno de los grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo y heteroarilo de R₁ y R₂ pueden estar adicionalmente sustituidos con uno o más grupos hidroxilo, halo, amino, alquilo, aralquilo, cicloalquilo, heterocíclico, arilo o heteroarilo. En algunas realizaciones, al menos uno de los grupos amino es un grupo alquilamino con la estructura -NHR, en la que R es alquilo C₁-C₆. En algunas realizaciones, al menos un grupo amino es un grupo cicloalquilamino o un grupo cicloalquilamino sustituido con hidroxilo con la fórmula -NHR, en la que R es cicloalquilo C₃-C₇, sustituido o sin sustituir con un grupo hidroxilo. En algunas realizaciones, al menos un grupo amino es un grupo aminoalquilo sustituido con heteroarilo, en que el grupo heteroarilo puede estar sustituido además con un sustituyente de grupos arilo.

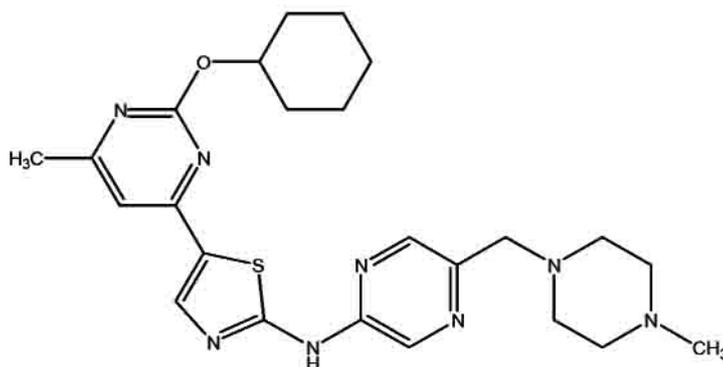
[0087] Los aril[a]pirrol[3,4-d]carbazoles incluyen, pero no se limitan a naftil[a]pirrol[3,4-c]carbazoles, indol[a]pirrol[3,4-c]carbazoles, quinolinil[a]pirrol[3,4-c]carbazoles e isoquinolinil[a]pirrol[3,4-c]carbazoles. Véase, por ejemplo, Engler y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003, 13, 2261-2267; Sanchez-Martinez y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003, 13, 3835-3839; Sanchez-Martinez y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003, 13, 3841-3846; Zhu y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003, 13, 1231-1235; y Zhu y col., J. Med. Chem., 2003, 46, 2027-2030. En las publicaciones de patente de los EE. UU. n.º 2003/0229026 y 2004/0048915 también se desvelan aril[a]pirrol[3,4-d]carbazoles adecuados.

[0088] Las ureas sustituidas con heteroarilo que contiene nitrógeno son compuestos que comprenden una fracción de urea en la que uno de los átomos de nitrógeno está sustituido con un grupo heteroarilo que contiene nitrógeno. Los grupos heteroarilo que contienen nitrógeno incluyen, pero no se limitan a grupos arilo de cinco a siete miembros que incluyen al menos un átomo de nitrógeno. Por lo tanto, los grupos heteroarilo que contienen nitrógeno incluyen, por ejemplo, piridina, pirrol, indol, carbazol, imidazol, tiazol, isoxazol, pirazol, isotiazol, pirazina, triazol, tetrazol, pirimidina, piridazina, purina, quinolina, isoquinolina, quinoxalina, cinolina, quinazolina, bencimidazol, ftalimida y similares. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo que contiene nitrógeno puede estar sustituido con uno o más grupos alquilo, cicloalquilo, heterocíclico, aralquilo, arilo, heteroarilo, hidroxilo, halo, carbonilo, carboxilo, nitro, ciano, alcoxilo o amino. En algunas realizaciones, la urea sustituida con un heteroarilo que contiene nitrógeno es una pirazol-3-ilurea. El pirazol puede estar sustituido adicionalmente con un grupo cicloalquilo o heterocíclico. En algunas realizaciones, la pirazol-3-ilurea es:



[0089] Véase Ikuta y col., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 27548-27554. Otras ureas adicionales que pueden usarse de acuerdo con la materia presentemente desvelada incluyen los compuestos biarílicos de urea de la fórmula (I) descrita en la publicación de patente de los EE. UU. n.º 2007/0024147. Véase también Honma y col., *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 4615-4627; y Honma y col., *J. Med. Chem.*, 2001, 44, 4628-4640.

[0090] Shimamura y col. describen inhibidores 5-pirimidinil-2-aminotiazólicos adecuados de CDK4/6. Véase Shimamura y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16, 3751-3754. En algunas realizaciones, el 5-pirimidinil-2-aminotiazol tiene la estructura:



[0091] Los compuestos útiles de benzotiadiazina y acridinona incluyen, por ejemplo, los desvelados por Kubo y col. Véase Kubo y col., *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 4279-4286 y la publicación de patente de los EE. UU. n.º 2004/0006074.

[0092] En algunas realizaciones, la benzotiadiazina está sustituida con uno o más grupos halo, haloarilo o alquilo. En algunas realizaciones, la benzotiadiazina se selecciona del grupo que consta de 1,1-dióxido de 4-(4-fluorobencilamino)-1,2,3-benzotiadiazina, 1,1-dióxido de 3-cloro-4-metil-4H-benzo[e][1,2,4]tiadiazina y 1,1-dióxido de 3-cloro-4-etil-4H-benzo[e][1,2,4]tiadiazina. En algunas realizaciones, la acridinona está sustituida con uno o más grupos amino o alcoxi. En algunas realizaciones, la acridinona se selecciona del grupo que consta de 3-amino-10H-acridona-9-tiona (3ATA), 9(10H)-acridinona, 1,4-dimetoxi-10H-acridina-9-tiona y 2,2'-difetilamino-bis-[N,N'-(3-amido-N-metilamino)-10H-acridina-9-tiona].

[0093] En algunas realizaciones, el sujeto de la invención presentemente desvelada será un sujeto que ha estado expuesto, está expuesto o se prevé que esté expuesto a un agente que daña el ADN mientras recibe un tratamiento terapéutico contra una enfermedad proliferativa. Tales enfermedades proliferativas incluyen enfermedades cancerosas. Por ejemplo, se piensa que los compuestos presentemente desvelados son eficaces para la protección de las HSPC sanas durante el tratamiento quimioterapéutico de una amplia gama de tipos tumorales, incluidos, pero sin limitarse a los siguientes: de mama, próstata, ovárico, de piel, pulmón, colorrectal, cerebro (es decir, glioma) y renal.

[0094] Idealmente, es preferible que el inhibidor selectivo de CDK4/6 no afecte a la eficacia del agente que daña el ADN por sí mismo en la detención del crecimiento de las células cancerosas. La mayoría de los cánceres no parecen depender de las actividades de CDK4/6 para su proliferación, ya que pueden usar las cinasas proliferativas promiscuamente (por ejemplo, pueden usar CDK1/2/4 o 6) o carecen de la función de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (RB) que es inactivada por las CDK. Por consiguiente, la inhibición aislada de CDK4/6 no debe perjudicar la respuesta al agente que daña el ADN en la mayoría de los cánceres. Como entenderá un experto en la técnica al revisar la presente descripción, la sensibilidad potencial de ciertos tumores a la inhibición de CDK4/6 puede deducirse a partir del tipo de tumor y la genética molecular. Los cánceres que no se espera que sean afectados por la inhibición de CDK4/6 son aquellos que pueden caracterizarse por uno o más del grupo que incluye, pero no se limita a un aumento de la actividad de CDK1 o CDK2, pérdida o ausencia de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (RB), altos niveles de expresión de MYC, aumento de la ciclina E (por ejemplo, E1 o E2) y aumento de la ciclina A o expresión de una proteína inactivadora de RB (como E7, codificada por el VPH). Tales cánceres incluyen, pero no se limitan al cáncer de pulmón microcítico, retinoblastoma, cánceres positivos para VPH como el cáncer cervical y ciertos cánceres de cabeza y cuello, tumores con MYC amplificado como el linfoma de Burkitts y el cáncer de mama triple negativo; ciertas clases de sarcoma, ciertas clases de carcinoma de pulmón no microcítico, ciertas clases de melanoma, ciertas clases de cáncer pancreático, ciertas clases de leucemia, ciertas clases de linfoma, ciertas clases de cáncer cerebral, ciertas clases de cáncer de colon, ciertas clases de cáncer de próstata, ciertas clases de cáncer ovárico, ciertas clases de cáncer uterino, ciertas clases de cáncer de tiroides y otros cánceres de tejido endocrino, ciertas clases de cánceres salivales, ciertas clases de carcinomas tímicos, ciertas clases de cánceres de riñón, ciertas clases de cánceres de vejiga y ciertas clases de cánceres testiculares.

[0095] Por ejemplo, en algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón microcítico, retinoblastoma y cáncer de mama triple negativo (negativo para ER/PR/Her2) o “de tipo basal”. El cáncer de pulmón microcítico y el retinoblastoma casi siempre inactivan la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (RB) y, por consiguiente, no requieren la actividad de CDK4/6 para su proliferación. Por tanto, el tratamiento con un inhibidor de CDK4/6 producirá quiescencia farmacológica en la médula ósea y otras células normales del huésped, pero no en el tumor. El cáncer de mama triple negativo (de tipo basal) también es casi siempre genética o funcionalmente nulo para RB. Además, ciertos cánceres inducidos por virus (por ejemplo, el cáncer cervical y algunos cánceres de cabeza y cuello) expresan una proteína vírica (E7) que inactiva RB, lo que hace que estos tumores sean funcionalmente nulos para RB. También se piensa que algunos cánceres de pulmón están causados por el VPH. Como entenderá un experto en la técnica, los cánceres de los que no se espera que sean afectados por los inhibidores de CDK4/6 (por ejemplo, aquellos que son nulos para RB, que expresan la proteína vírica E7 o que sobreexpresan MYC) pueden determinarse por procedimientos que incluyen, pero no se limitan al análisis de ADN, inmunotinción, análisis de inmunotransferencia y determinación de perfiles de expresión génica.

[0096] De acuerdo con la materia presentemente desvelada, el agente que daña el ADN puede administrarse a un sujeto con cualquier programación y en cualquier dosis conforme con el curso prescrito del tratamiento, siempre que el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 se administre antes, durante o después de la administración del agente que daña el ADN. Generalmente, el compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 puede administrarse al sujeto durante el periodo de tiempo que se extiende desde 24 horas antes de la exposición al agente que daña el ADN hasta 24 horas después de la exposición. Sin embargo, este periodo de tiempo puede extenderse a un momento anterior a las 24 horas antes de la exposición al agente que daña el ADN (por ejemplo, basado en el tiempo que necesita el compuesto químico cualquiera que daña el ADN usado para alcanzar las concentraciones plasmáticas adecuadas y/o en la semivida plasmática del compuesto que daña el ADN). Además, el periodo de tiempo puede extenderse más allá de las 24 horas después de la exposición al agente que daña el ADN, siempre que la administración tardía del inhibidor de CDK4/6 produzca al menos algún efecto protector. Este tratamiento posexposición puede ser especialmente útil en casos de exposición accidental o sobredosis.

[0097] En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 puede administrarse al sujeto en un periodo de tiempo anterior a la administración del agente que daña el ADN, de manera que los niveles plasmáticos del inhibidor selectivo de CDK4/6 alcancen el máximo en el momento de la administración del agente que daña el ADN. Si es conveniente, el inhibidor selectivo de CDK4/6 puede administrarse al mismo tiempo que el agente que daña el ADN, con el fin de simplificar el régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, el quimioprotector y el agente o agentes que dañan el ADN pueden administrarse en una única formulación.

[0098] Si se desea, pueden administrarse al sujeto múltiples dosis del compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6. Alternativamente, puede administrarse una sola dosis del inhibidor selectivo de CDK4/6 al sujeto.

[0099] La materia presentemente desvelada se refiere a composiciones farmacéuticas para usar en

procedimientos para aumentar la eficacia de un agente reductor de la toxicidad en un sujeto que necesita un tratamiento del mismo, en que el procedimiento comprende: proporcionar un sujeto que ha estado expuesto, está expuesto o presenta riesgo de exposición a un agente que daña el ADN; administrar a dicho sujeto un agente reductor de la toxicidad que es un factor de crecimiento; y administrar a dicho sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto que inhibe selectivamente CDK4 y/o CDK6.

[0100] Idealmente, el agente reductor de la toxicidad no presenta actividad inhibitoria selectiva de CDK4/6.

[0101] El agente reductor de la toxicidad es un agente que se usa para, o del que se sabe que tiene la capacidad de reducir la citotoxicidad o efectos secundarios no deseados relacionados con el uso de (o exposición a) una sustancia quimioterapéutica. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad es un agente que se usa para, o del que se sabe que tiene la capacidad de reducir la citotoxicidad o efectos secundarios no deseados relacionados con el uso de (o exposición a) radiación. Por lo tanto, el agente reductor de la toxicidad es un quimioprotector o un radioprotector.

[0102] El agente reductor de la toxicidad es un agente que se usa de manera que un sujeto que está siendo tratado contra el cáncer u otra enfermedad proliferativa pueda tolerar una dosis mayor de una sustancia quimioterapéutica o de radiación. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad se usa de manera que un sujeto que está siendo tratado contra el cáncer pueda tratarse más frecuentemente con una sustancia quimioterapéutica o con radiación. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad se usa para reducir o prevenir efectos secundarios asociados con el uso del agente que daña el ADN tales como, pero sin limitarse a náusea, vómitos, pérdida del cabello, anemia, fatiga, neuropatía periférica, problemas hemorrágicos, diarrea, estreñimiento y similares.

[0103] El agente reductor de la toxicidad usado de acuerdo con la invención es un factor de crecimiento o un derivado del mismo. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad se selecciona del grupo que comprende factores de crecimiento, un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un G-CSF pegilado, un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), trombopoyetina, eritropoyetina (EPO), eritropoyetina pegilada, interleucina (IL) 12, el factor acero, un factor de crecimiento de queratinocitos o derivados (por ejemplo, compuestos modificados químicamente con estructuras basadas en uno de los agentes reductores de la toxicidad mencionados anteriormente, tales como derivados alquilados o esterificados) o combinaciones de los mismos.

[0104] En algunas realizaciones, el uso del agente reductor de la toxicidad y el inhibidor selectivo de CDK4/6 pueden resultar en efectos protectores sinérgicos frente al agente que daña el ADN. En algunas realizaciones el compuesto que inhibe selectivamente CDK4 o CDK6 induce quiescencia farmacológica en una o más células del sujeto. Por ejemplo, el tratamiento transitorio (por ejemplo, durante un periodo de aproximadamente 48 horas o menos) con el compuesto que selectivamente inhibe CDK4 y/o CDK6 puede inducir temporalmente quiescencia farmacológica en una o más células en el sujeto. En algunas realizaciones, las una o más células en las que se induce la quiescencia farmacológica son, por ejemplo, células hemáticas, células madre hemáticas y/o células precursoras hemáticas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, pueden usarse un factor de crecimiento y un compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 en un procedimiento para proporcionar efectos sinérgicos en el rescate y apoyo de diversas poblaciones hematopoyéticas frente a un agente que daña el ADN.

[0105] El agente reductor de la toxicidad y el compuesto que inhibe selectivamente CDK4 y/o CDK6 pueden administrarse conjuntamente (por ejemplo, en la misma formulación o al mismo tiempo en formulaciones independientes) o en momentos diferentes. El agente reductor de la toxicidad o el inhibidor de CDK4/6 o ambos pueden administrarse como dosis única o en dosis múltiples. En algunas realizaciones, el agente reductor de la toxicidad o el inhibidor de CDK4/6 pueden administrarse antes de la exposición al agente que daña el ADN, mientras que el otro de entre el inhibidor de CDK4/6 y el agente reductor de la toxicidad puede administrarse durante o después de la exposición al agente que daña el ADN. En algunas realizaciones, tanto el inhibidor de CDK4/6 como el agente reductor de la toxicidad pueden administrarse durante la exposición al agente que daña el ADN (por ejemplo, durante la administración de la quimio o radioterapia). Alternativamente, ambos pueden administrarse antes o después de la exposición al agente que daña el ADN. En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe selectivamente CDK4 y/o CDK6 se administra al sujeto entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas (por ejemplo, aproximadamente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 48 horas) después de la exposición del sujeto al agente que daña el ADN.

[0106] El compuesto que inhibe selectivamente CDK4/6 puede administrarse en cualquier momento adecuado

antes, durante o después de la exposición del sujeto al agente que daña el ADN. En algunas realizaciones, el inhibidor selectivo de CDK4/6 se administra al sujeto entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas (por ejemplo, aproximadamente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 horas) después de la exposición del sujeto al agente que daña el ADN.

5

III. Compuestos activos, sales y formulaciones

[0107] Según se usa en este documento, el término “compuesto activo” se refiere a un compuesto inhibidor selectivo de CDK4/6 o a un profármaco (tal como, pero sin limitarse a diversos ésteres y otros derivados que pueden formar el inhibidor selectivo de CDK4/6 *in vitro* o *in vivo*), un solvato (tal como, pero sin limitarse a un hidrato) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto activo puede administrarse al sujeto mediante cualquier estrategia adecuada. Por supuesto, la cantidad y el momento en que puede administrarse el compuesto activo pueden depender del sujeto que se trate, de la dosis del agente que daña el ADN al que el sujeto ha estado, está o se anticipa que estará expuesto, del modo de administración, de las propiedades farmacocinéticas del compuesto activo y del criterio del médico a cargo. Por lo tanto, debido a la variabilidad entre sujetos, las dosis indicadas a continuación son una orientación y el médico puede valorar las dosis del compuesto para conseguir el tratamiento que considera apropiado para el sujeto. Al considerar el grado de tratamiento deseado, el médico puede sopesar una serie de factores como la edad y el peso del sujeto, la presencia de una enfermedad preexistente, así como la presencia de otras enfermedades. Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas para cualquier vía de administración deseada, incluidas pero sin limitarse a la administración por vía oral, intravenosa o en aerosol, según se expone más detalladamente a continuación.

[0108] La dosis terapéutica eficaz de cualquier compuesto activo específico, cuyo uso se encuentra dentro del alcance de las realizaciones descritas en este documento, puede variar en cierta medida de un compuesto a otro y de un sujeto a otro y puede depender del estado del sujeto y de la vía de administración. Como proposición general, una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/kg puede tener eficacia terapéutica, con todos los pesos calculados con respecto al peso del compuesto activo, incluidos los casos en los que se emplea una sal. En algunas realizaciones, la dosis puede ser la cantidad de compuesto necesaria para proporcionar una concentración sérica del compuesto activo de hasta aproximadamente 1 a 5 μM o mayor. Los problemas de toxicidad en el nivel superior pueden restringir las dosis intravenosas a un nivel inferior, como de hasta aproximadamente 10 mg/kg, con todos los pesos calculados con respecto al peso de la base activa, incluidos los casos en los que se emplea una sal. Para la administración por vía oral puede emplearse una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Típicamente, para una inyección intramuscular puede emplearse una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg a 5 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis pueden ser de aproximadamente 1 $\mu\text{mol/kg}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{mol/kg}$ u, opcionalmente, de entre aproximadamente 22 $\mu\text{mol/kg}$ y aproximadamente 33 $\mu\text{mol/kg}$ del compuesto para administración por vía intravenosa u oral.

[0109] De acuerdo con la invención presentemente desvelada, los compuestos farmacéuticamente activos según se describen en este documento pueden administrarse por vía oral como sólido o como líquido o pueden administrarse por vía intramuscular, intravenosa o por inhalación como disolución, suspensión o emulsión. En algunas realizaciones, los compuestos o sales también pueden administrarse por inhalación, por vía intravenosa o intramuscular como suspensión de liposomas. Cuando se administran por inhalación, el compuesto activo o sal puede estar en forma de una pluralidad de partículas sólidas o pequeñas gotas con un tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 μm y opcionalmente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 μm .

45

[0110] Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender un compuesto activo descrito en este documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. Si se desea una disolución, el vehículo elegido es agua para los compuestos o sales solubles en agua. Para los compuestos o sales solubles en agua, puede ser adecuado un vehículo orgánico como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol o mezclas de los mismos. En el último caso, el vehículo orgánico puede contener una cantidad sustancial de agua. En cada caso, la disolución puede esterilizarse después de manera adecuada conocida por los expertos en la técnica y, típicamente por filtración a través de un filtro de 0,22 μm . Después de la esterilización, la disolución puede distribuirse en recipientes apropiados como viales de vidrio despirogenados. La distribución se hace opcionalmente por un procedimiento aséptico. Después, pueden colocarse cierres esterilizados en los viales y, si se desea, el contenido de los viales puede liofilizarse.

[0111] Además de los compuestos activos o sus sales, las formulaciones farmacéuticas pueden contener otros aditivos como aditivos de ajuste del pH. En particular, los agentes útiles para ajuste del pH incluyen ácidos como ácido clorhídrico, bases o tampones como lactato de sodio, acetato de sodio, fosfato de sodio, citrato de sodio,

borato de sodio o gluconato de sodio. Además, las formulaciones pueden contener conservantes antimicrobianos. Los conservantes antimicrobianos útiles incluyen metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico. Típicamente se emplea un conservante antimicrobiano cuando la formulación se pone en un vial diseñado para uso en dosis múltiples. Las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento pueden liofilizarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

[0112] Para su administración por vía oral, una composición puede estar en forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos y similares. Se emplean comprimidos que contienen diversos excipientes como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio, junto con diversos disgregantes como almidón (por ejemplo, de patata o tapioca) y ciertos silicatos complejos, y con aglutinantes como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, los agentes lubricantes como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco a menudo son muy útiles para la preparación de los comprimidos. También se emplean composiciones sólidas de un tipo similar como relleno de cápsulas de gelatina blanda y dura. Los materiales relacionados con lo anterior también incluyen lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para administración por vía oral, los compuestos de la materia presentemente desvelada pueden combinarse con diversos edulcorantes, aromas, colorantes, emulsionantes y/o agentes de suspensión, así como con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones de los mismos.

[0113] En otra realización más del objeto descrito en este documento, se proporciona una formulación inyectable estéril y estable que comprende un compuesto activo según se describe en este documento o una sal del mismo en una forma de dosificación unitaria en un envase cerrado herméticamente. El compuesto o la sal se proporcionan en forma liofilizada, la cual puede reconstituirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una formulación líquida adecuada para su inyección en un sujeto. Si el compuesto o sal es sustancialmente insoluble en agua, puede emplearse un emulsionante fisiológicamente aceptable en cantidad suficiente para emulsionar el compuesto o la sal en un vehículo acuoso. Los emulsionantes especialmente útiles incluyen fosfatidilcolinas y lecitina.

[0114] Otras realizaciones adicionales proporcionadas en este documento incluyen formulaciones liposómicas de los compuestos activos desvelados en dicho documento. La tecnología para la formación de las suspensiones liposómicas es bien conocida en la técnica. Cuando el compuesto es una sal soluble en agua, esta puede incorporarse en vesículas lipídicas mediante la tecnología de liposomas convencional. En tal caso, debido a la solubilidad en agua del compuesto activo, este puede estar sustancialmente atrapado dentro del centro o núcleo hidrófilo de los liposomas. La capa lipídica empleada puede ser de cualquier composición convencional y puede contener colesterol o no contenerlo. Cuando el compuesto activo de interés es insoluble en agua, de nuevo mediante el empleo de la tecnología convencional de formación de liposomas, la sal puede atraparse sustancialmente dentro de la bicapa lipídica hidrófoba que forma la estructura del liposoma. En cualquier caso, los liposomas que se producen reducirse de tamaño, por ejemplo, mediante el uso de técnicas estándar de sonicación y homogeneización. Las formulaciones liposómicas que comprenden los compuestos activos desvelados en este documento pueden liofilizarse para producir un liofilizado, el cual puede reconstituirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como agua, para regenerar una suspensión liposómica.

[0115] También se proporcionan formulaciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración como aerosol por inhalación. Estas formulaciones comprenden una disolución o suspensión de un compuesto deseado descrito en este documento o una sal del mismo, o una pluralidad de partículas sólidas del compuesto o la sal. La formulación deseada puede colocarse en una pequeña cámara y nebulizarse. La nebulización puede conseguirse mediante aire comprimido o energía ultrasónica para formar una pluralidad de pequeñas gotas de líquido o de partículas sólidas que comprenden los compuestos o las sales. Las pequeñas gotas de líquido o las partículas sólidas deben tener un tamaño de partícula en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 μm y opcionalmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 μm . Las partículas sólidas pueden obtenerse mediante el procesamiento del compuesto sólido o una sal del mismo de cualquier manera apropiada en la técnica, por ejemplo, por micronización. Opcionalmente, el tamaño de las partículas sólidas o las pequeñas gotas puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 μm . A este respecto, hay nebulizadores disponibles comercialmente para conseguir este fin. Los compuestos pueden administrarse por medio de una suspensión en aerosol de partículas respirables, de la manera expuesta en la patente de los EE. UU n° 5.628.984.

[0116] Cuando la formulación farmacéutica adecuada para su administración como aerosol está en forma líquida, dicha formulación puede comprender un compuesto activo soluble en agua en un vehículo que comprende agua. Puede haber presente un tensioactivo que disminuye la tensión superficial de la formulación suficientemente

para dar lugar a la formación de pequeñas gotas en el intervalo de tamaños deseado cuando se someten a nebulización.

[0117] Según se indica, se proporcionan compuestos activos tanto solubles en agua como insolubles en agua.

5 Según se usa en este documento, el término “soluble en agua” pretende definir cualquier composición que es soluble en agua en una cantidad de aproximadamente 50 mg/ml o superior. Asimismo, según se usa en este documento, el término “insoluble en agua” pretende definir cualquier composición que tiene una solubilidad en agua inferior a aproximadamente 20 mg/ml. En algunas realizaciones, pueden ser deseables compuestos o sales solubles en agua mientras que en otras realizaciones pueden ser igualmente deseables compuestos o sales insolubles en
10 agua.

[0118] El término “sales farmacéuticamente aceptables”, según se usa en este documento, se refiere a aquellas sales que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuadas para uso en contacto con sujetos (por ejemplo, sujetos humanos) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, en
15 proporción con una relación beneficio/riesgo razonable y eficaces para el uso destinado, así como las formas dipolares, en caso de que sea posible, de los compuestos de la materia presentemente desvelada.

[0119] Por lo tanto, el término “sales” se refiere a las sales de adición de ácido orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas de los compuestos de la materia presentemente desvelada. Estas sales pueden prepararse
20 *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. En la medida en que los compuestos de la materia presentemente desvelada son compuestos básicos, son capaces de formar una amplia diversidad de sales diferentes con diversos ácidos orgánicos e inorgánicos. Aunque tales sales deben ser farmacéuticamente aceptables para su administración a animales, a menudo en la práctica es
25 deseable aislar inicialmente el compuesto básico de la mezcla de reacción como sal farmacéuticamente inaceptable para después convertirlo simplemente en la base libre por tratamiento con un reactivo alcalino y a continuación convertir la base libre en una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. Las sales de adición de ácido de los compuestos básicos se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal de la manera convencional. La forma de base libre puede regenerarse poniendo
30 la forma de sal en contacto con una base y aislando la base libre de la manera convencional. Las formas de base libre difieren en cierto modo de sus formas de sal respectivas en algunas propiedades físicas como la solubilidad en disolventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a sus formas de base libre respectivas para los fines de la materia presentemente desvelada.

35 **[0120]** Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, como hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Algunos ejemplos de metales usados como cationes incluyen, pero no se limitan a sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Algunos ejemplos de aminas adecuadas incluyen, pero no se limitan a *N,N*-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, *N*-metilglucamina y procaína.
40

[0121] Las sales de adición de base de compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de la manera convencional. La forma de ácido libre puede regenerarse poniendo la forma de sal en contacto con un ácido y aislando el ácido libre de la manera convencional. Las formas de ácido libre difieren en cierto modo de sus formas de sal respectivas en algunas
45 propiedades físicas como la solubilidad en disolventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a sus formas de ácido libre respectivas para los fines de la materia presentemente desvelada.

[0122] Las sales pueden prepararse a partir de los ácidos inorgánicos sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, nitrato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro,
50 yoduro, así como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares. Algunas sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, Laurilsulfonato e isetionato. Las sales también pueden prepararse a partir de ácidos orgánicos, como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos
55 con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos y ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc. y similares. Algunas sales representativas incluyen acetato, propionato, caprilato, isobutirato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, mandelato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, fenilacetato, citrato, lactato, maleato, tartrato, metanosulfonato y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir cationes basados en

los metales alcalinos y alcalinotérreos como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes amínicos incluidos, pero sin limitarse a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. También se contemplan las sales de aminoácidos como arginato, gluconato, galacturonato y similares. Véase, por ejemplo, Berge y col., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

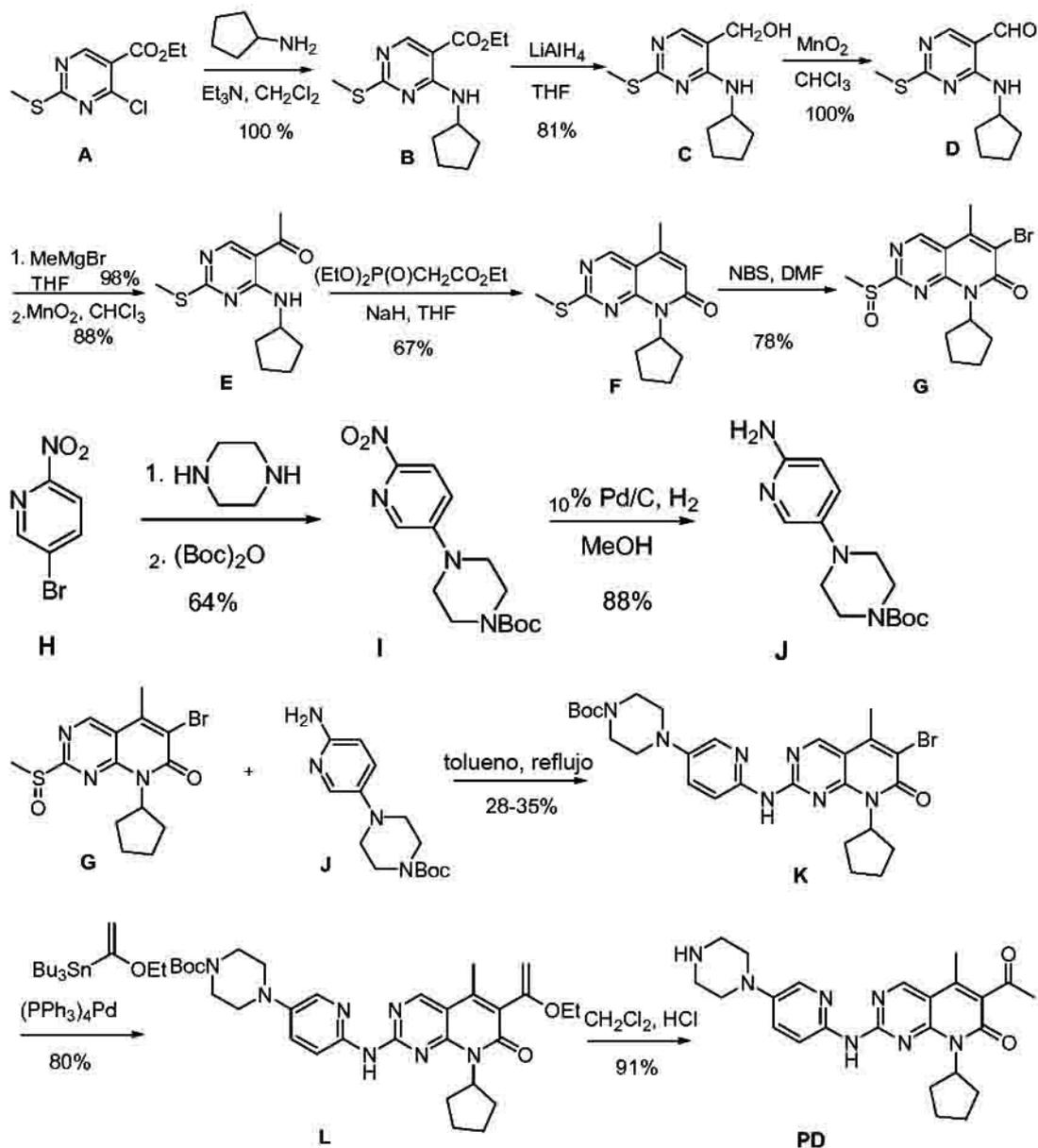
EJEMPLOS

- [0123]** Los ejemplos siguientes proporcionan realizaciones ilustrativas y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la materia presentemente desvelada. A la luz de la presente descripción y del nivel general de conocimiento de la técnica, los expertos apreciarán que los ejemplos siguientes pretenden solamente ser ejemplares y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin salirse del alcance de la materia presentemente desvelada.
- 15 **[0124]** A menos que se indique lo contrario, la práctica de la materia presentemente desvelada puede emplear procedimientos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman y Cía., 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a edición, 1989); *Methods in Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg, *Advanced Organic Chemistry* 3.^a edición (Plenum Press) volúmenes A y B (1992).
- 20

Ejemplo 1

25 Síntesis de PD

[0125]

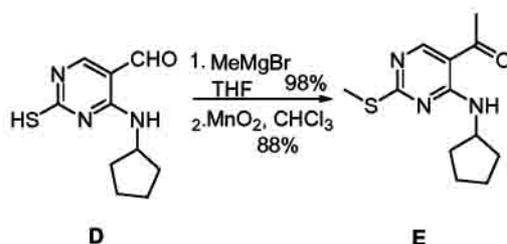


Esquema 1: Síntesis de PD.

[0126] PD se sintetizó según se muestra anteriormente en el esquema 1. Las reacciones mostradas en el esquema 1 siguieron en general procedimientos descritos previamente (véase VandellWel y col., J. Med Chem., 48, 5 2371-2387 (2005); y Toogood y col., J. Med. Chem., 48, 2388-2406 (2005)), con las excepciones de la reacción de conversión del compuesto **D** en el compuesto **E** y la reacción de conversión del compuesto **F** en el compuesto **G**.

Conversión del compuesto **D** en el compuesto **E**:

10 **[0127]**



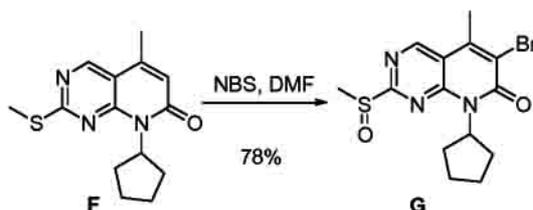
[0128] El compuesto **D** (40 g, 169 mmol) se disolvió en THF anhidro (800 ml) en atmósfera de nitrógeno y la disolución se enfrió en un baño de hielo, se le añadió lentamente MeMgBr (160 ml, 480 mmol, 3 M en éter) y se agitó durante 1 h. La reacción se detuvo con NH₄Cl acuoso saturado y se repartió entre agua y EtOAc. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. La concentración dio un producto intermedio como un aceite (41,9 g, 98 %).

[0129] El intermedio anterior (40 g, 158 mmol) se disolvió en CHCl₃ seco (700 ml). Se añadió MnO₂ (96 g, 1,11 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo con agitación durante 18 h, en que se añadió más MnO₂ (34 g, 395 mmol) y se continuó el reflujo durante 4 h. El sólido se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con CHCl₃. El filtrado se concentró para dar un compuesto sólido amarillo **E** (35 g, 88 %), pf: 75,8-76,6 °C.

Conversión del compuesto **F** en el compuesto **G**:

15

[0130]



20 **[0131]** El compuesto **F** (5 g, 18,2 mmol) se disolvió en DMF anhidra (150 ml) y se le añadió NBS (11,3 g, 63,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 h y después se vertió sobre H₂O (500 ml). El precipitado se filtró y se lavó con H₂O. El sólido se recrystalizó a partir de EtOH para dar el compuesto **G** como un sólido blanco (5,42 g, 80,7 %), pf: 210,6-211,3 °C.

25 Datos de caracterización de PD:

[0132] CL-EM: 448,5 (ESI, M+H). Pureza: ~ 99 %.

30 **[0133]** RMN ¹H (300 MHz, D₂O): 9,00 (s, 1H); 8,12 (dd, J = 9,3 Hz, 2,1 Hz, 1H); 7,81 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 7,46 (d, J = 9,6 Hz, 1H); 5,80-5,74 (m, 1H); 3,57-3,48 (m, 8H); 2,48 (s, 3H); 2,37 (s, 3H); 2,13-1,94 (m, 6H); 1,73-1,71 (m, 2H).

[0134] RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): 203,6; 159,0; 153,5; 153,3; 152,2; 139,9; 139,4; 139,2; 133,1; 129,0; 118,7; 113,8; 107,4; 51,8; 42,2; 40,0; 28,0; 25,2; 22,6; 10,8.

35

Ejemplo 2

Procedimientos generales para los estudios *in vitro* e *in vivo*

40 **[0135]** Compuestos: PD0332991 se sintetizó según se describe en el ejemplo 1.

[0136] Células, análisis del ciclo celular, γH2AX por citometría de flujo, análisis de proliferación celular y toxicidad celular: Las células epiteliales proximales primarias de riñón humano normales (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, Virginia, Estados Unidos) se cultivaron en medio básico para células epiteliales

renales enriquecido con un kit de crecimiento para células epiteliales renales de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo con BrdU (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, EE. UU.) o EdU (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE. UU.) y yoduro de propidio, siguiendo los protocolos de los fabricantes. Para el ensayo de γ H2AX, las células se fijaron, se permeabilizaron y tiñeron con anti- γ H2AX mediante un kit de flujo para γ H2AX (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Los niveles de γ H2AX se determinaron por citometría de flujo. La proliferación celular se evaluó sembrando 1×10^3 células por pocillo en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos en 100 μ l de medio de cultivo. Las células se trataron según se indica con los inhibidores de CDK4/6 y etopósido. Después del tratamiento, se permitió la recuperación de las células durante siete días en medio de cultivo normal. Al final del periodo de recuperación, las células se cuantificaron con CellTiter-Glo® (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Estados Unidos) o el reactivo WST-1 (TaKaRa Bio USA, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). La toxicidad celular se evaluó con el kit para bioensayos TOXILIGHT™ (Lonza, Basilea, Suiza) que mide la citólisis cuantificando la liberación de adenilato-cinasa al medio de cultivo. Brevemente, se aspiraron 20 μ l de cada pocillo en placas de 96 pocillos de células tratadas con concentraciones variables de PD0332991. Se añadieron 100 μ l del reactivo TOXILIGHT™, se incubó durante cinco minutos y se llevó a cabo la lectura en un luminómetro a 1 segundo/pocillo.

[0137] *Animales:* Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de conformidad con el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Carolina del Norte. Se irradiaron ratones adultos jóvenes C57Bl/6 y FVB con un irradiador de ^{137}Cs AECL GammaGell 40 (Atomic Energy of Canada Ltd., Mississauga, Ontario, Canadá). A menos que se especifique lo contrario, los ratones analizados fueron hembras adultas jóvenes (8-12 semanas de edad) vírgenes C57Bl/6 o FVB adquiridas de Jackson Labs (Bar Harbor, Maine, Estados Unidos).

[0138] Los ratones C3-TAg son un modelo de cáncer de mama de tipo basal. Los ratones C3-TAg contienen un gen recombinante que expresa la secuencia transformante de la región temprana del virus del simio 40 (antígeno T mayor de SV40), que se ha demostrado que inactiva p53 y RB. El modelo MMTV-*c-neu* expresa *c-neu* (el gen ortólogo en ratón del HER2 humano) bajo el control del promotor del virus tumoral mamario de ratón (MMTV) y es un modelo de cáncer de mama HER2+. Al observar un tamaño de los tumores de $\sim 0,2 \text{ cm}^2$, los animales se trataron según se ha descrito y la respuesta tumoral se evaluó mediante medidas diarias con el calibrador.

[0139] *Preparación y dosificación del fármaco:* PD0332991 se disolvió en tampón de lactato de sodio (pH 4,0) hasta una concentración final de 15 mg/ml. Los ratones se trataron con una dosis de 150 mg/kg de PD0332991. 2BrIC (también denominado L4D en este documento) se solubilizó en DMSO y se añadió a las células en las que la concentración final de DMSO fue $<0,1 \%$.

[0140] *Análisis de la incorporación de BrdU:* Para los ensayos de proliferación en riñón, los ratones se trataron con una única dosis de PD0332991 (150 mg/kg, administración por vía oral) o de vehículo como control seguida de cisplatino (10 mg/kg IP). La proliferación se evaluó con BrdU (1 mg, inyección IP) cada seis horas durante 24 horas antes del sacrificio o 100 μ g de EdU (0,1 mg IP) cada 24 horas durante tres días antes del sacrificio.

[0141] *Análisis de la incorporación de EdU por citometría de flujo:* Se extirparon los riñones de los ratones y se aislaron células individuales mediante un disociador de tejidos gentleMACS™ (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Brevemente, los riñones se cortaron en trozos pequeños que se colocaron en 10 ml de colagenasa (1 mg/ml) en un tubo C de gentleMACS™ (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). El tejido se disoció según las recomendaciones del fabricante (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). A continuación, las células se incubaron durante cinco minutos en tampón ACK para lisar los glóbulos rojos, se filtraron y se sedimentaron. Las células se resuspendieron en paraformaldehído al 4 % y se almacenaron durante la noche a 4 °C. Para cuantificar la incorporación de EdU, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con un kit de flujo con APC para EdU de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Estados Unidos). El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo con un aparato CyAn ADP (Dako, Glostrup, Dinamarca). Para cada muestra se analizaron un mínimo de 500.000 células y los datos se procesaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, Estados Unidos).

[0142] *Ensayo de mielodepresión: hemogramas completos semanales:* En los experimentos de radioprotección, los ratones se trataron con 150 mg/kg de PD0332991 administrado por vía oral o con el vehículo como control una hora antes de su exposición a la radiación (6,5 Gy). La eritropoyetina (4.000 unidades/día) se administró a partir del día 3 después de la exposición a la radiación y se continuó durante tres días consecutivos.

[0143] En un subconjunto de ratones se llevó a cabo un análisis de hemograma completo (HgC) inicial antes

de la administración del fármaco. Después de la administración del fármaco (quimioterapia/radiación +/- inhibidor de CDK4/6/eritropoyetina o control), el análisis de HgC se realizó en los días 10 y 17 después del tratamiento. Mediante un corte en la vena de la cola, se recogieron 40 µl de sangre en tubos BD Microtainer con K2E (K₂EDTA). La sangre se analizó mediante un sistema de hematología veterinaria Hevamet CBC-Diff (Drew Scientific Inc., Dallas, Texas, Estados Unidos). El análisis de HgC incluyó la determinación de los glóbulos blancos, linfocitos, granulocitos, monocitos, hematocrito, glóbulos rojos, hemoglobina, plaquetas y otros parámetros hemáticos comunes.

[0144] *Análisis estadístico:* A menos que se indique lo contrario, las comparaciones se llevan a cabo mediante ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples en caso apropiado. Las barras de error representan +/- el error estándar de la media (EEM) o la desviación estándar según se indica.

Ejemplo 3

Aumento de la eficacia del factor de crecimiento por la inhibición de CDK4/6

[0145] A cohortes de ratones FVB de tipo natural se les administró placebo o un inhibidor de CDK4/6 (PD0332991, 150 mg/kg por vía oral) inmediatamente antes de recibir una dosis subletal de irradiación (6,5 Gy). A las 72, 96 y 120 horas después de la irradiación, se les administraron tres dosis de disolución salina normal (control) o 100 unidades de eritropoyetina (EPO) por inyección subcutánea. En total, hubo cuatro cohortes de tratamiento (PD0332991 + disolución salina, PD0332991 + EPO, disolución salina + EPO, disolución salina + disolución salina). El tamaño de la muestra para cada cohorte fue: control = 7; EPO = 8; PD0332991 = 8, PD/EPO = 6. Se llevaron a cabo extracciones de sangre sucesivas en el momento inicial, 10 después de la irradiación y 17 días después de la irradiación. Se obtuvieron los hemogramas completos (HgC) para determinar el número de glóbulos rojos, de las diversas subpoblaciones de leucocitos y de plaquetas.

[0146] La EPO sola o en combinación con PD0332991 no tuvo efecto sobre las plaquetas (figura 1) ni sobre otros linajes celulares no eritrocíticos, mientras que las dos cohortes de tratamiento que recibieron PD0332991 mostraron un aumento del recuento de plaquetas (figura 1), así como de otros linajes celulares no eritrocíticos. La EPO sola no fue capaz de aumentar el linaje celular eritrocítico. Sin limitarse a una teoría, se piensa que esto es debido a que el tratamiento con EPO estimula la entrada en el ciclo celular de los progenitores eritrocíticos con daño en el ADN, lo que resulta en la subsiguiente apoptosis. Sin embargo, el tratamiento de los ratones con PD0332991 en combinación con EPO mostró un aumento notable de la función eritrocítica, como indican las mediciones aumentadas de GR, Hb y HCT. De nuevo, sin limitarse a ninguna teoría, se piensa que PD0332991 permite a los progenitores eritrocíticos reparar el daño en el ADN producido por la radiación y se piensa que el tratamiento subsiguiente con EPO estimula a los progenitores a acelerar la sustitución de los eritrocitos. En conclusión, los inhibidores de CDK4/6 parecen aumentar la eficacia de los factores de crecimiento para el rescate y apoyo de las diversas poblaciones hematopoyéticas después de la exposición a agentes que dañan el ADN como la radiación o la quimioterapia. Así por ejemplo, como parte de los regímenes de tratamiento contra el cáncer a base de quimioterapia, puede usarse la inhibición de CDK4/6 aproximadamente en el momento del daño al ADN para aumentar el apoyo del factor de crecimiento en la depresión de la médula ósea al permitir a las células madre y progenitoras de la médula ósea reparar el daño en el ADN antes de comenzar la administración del factor de crecimiento. Además, la inhibición de CDK4/6 mitigará a largo plazo (por ejemplo tres o más años después de la quimioterapia) las toxicidades para la médula ósea (por ejemplo, mielodisplasia) relacionadas con el uso de factores de crecimiento en pacientes de cáncer que sobreviven a la enfermedad.

[0147] La inhibición de CDK4/6 aproximadamente en el momento de la exposición que daña el ADN puede aumentar la eficacia de los factores de crecimiento tales como (pero sin limitarse a) G-CSF y derivados (por ejemplo, G-CSF pegilado), GM-CSF y derivados, trombopoyetina y derivados, eritropoyetina y derivados (por ejemplo, eritropoyetina pegilada), IL12, factor acero o factores de crecimiento de queratinocitos. Estos agentes, especialmente G-CSF, GM-CSF y eritropoyetina y derivados se usan clínicamente para reducir la toxicidad de la quimioterapia y la radiación en el tratamiento de los pacientes de cáncer. La inducción de quiescencia farmacológica a través de la inhibición de CDK4/6 aproximadamente en el momento de la exposición que daña el ADN puede aumentar la eficacia de estos agentes en un momento posterior (por ejemplo, la administración de los factores de crecimiento se inicia normalmente 24-72 horas después del agente terapéutico que daña el ADN).

Ejemplo 4 (ejemplo de referencia)

Protección de tejidos y células no hemáticos por la inhibición de CDK4/6

[0148] El uso de un inhibidor de CDK4/6 potente y selectivo como PD0332991 induce una parada en G1 en células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales. Véanse las figuras 2A y 2B. Se observó un aumento dependiente de la dosis en la fracción G0/G1 del ciclo celular con un descenso consumado en las fracciones G2/M y fase S. En ello, las células entran en quiescencia farmacológica y se mantienen en este estado hasta que se liberan de la parada.

[0149] Las células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales se sembraron y se expusieron 24 horas después a PD0332991 en concentraciones de 0,10 mM, 30 nM, 100 nM, 300 nM o 1 μ M. A las 16 horas del tratamiento, las células se recogieron por procedimientos estándar y se fijaron en metanol enfriado en hielo hasta el momento de la tinción del ADN. Las muestras se procesaron y el ADN se tiñó con una disolución de yoduro de propidio (PI) y se analizaron por citometría de flujo. Los archivos FCS del citómetro de flujo se analizaron posteriormente mediante el software para análisis del ciclo celular Mod-Fit™ de Verity (Verity Software House, Topsham, Maine, Estados Unidos), en que las fracciones del ciclo celular se calcularon como porcentaje de la población total.

[0150] La inhibición de CDK4/6 bloquea la proliferación de las células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales. Estas células se sembraron a una densidad apropiada en placas de 96 pocillos que se incubaron durante 24 horas a 37 °C en un incubador humificado con CO₂ al 5 %. Las células se expusieron a continuación a un inhibidor potente y selectivo de CDK4/6, en este caso PD0332991, en un amplio intervalo de dosis 24 horas después. El intervalo de dosis de PD0332991 explorado fue 0, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M o 3 μ M. A las 72 horas después de la exposición, las células en las que se había inhibido CDK4/6 se trataron con CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) siguiendo las especificaciones del fabricante. La placa se leyó en un luminómetro a 1 segundo/pocillo. Los resultados se analizaron en Microsoft Excel. En la figura 3 se observa una clara inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis en presencia de este inhibidor en comparación con el control de DMSO a las 72 horas después del tratamiento. Este resultado, junto con las figuras 2A y 2B, demuestra que las células no hemáticas dependientes de CDK4/6 pueden entrar en quiescencia farmacológica y de este modo se inhibe su proliferación.

[0151] La inhibición de CDK4/6 anula el daño en el ADN inducido por etopósido en células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales. En cultivos celulares expuestos a moléculas pequeñas que dañan el ADN o a radiación ionizante, se generan rápidamente roturas en el ADN bicatenario que conducen a la fosforilación de H2AX. La fosforilación de H2AX se corresponde con roturas del ADN bicatenario. En la figura 4, se sembraron células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales y se trataron 24 horas después con PD0332991 0, 100 nM, 300 nM o 1 μ M. A las 16 horas, estas muestras se expusieron a etopósido 2,5 μ M durante ocho horas. A continuación, las muestras se recogieron, se fijaron y se tiñeron para detectar γ H2AX mediante el kit de ensayos de fosforilación de H2AXx de Millipore Corporation para citometría de flujo (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). Las muestras se analizaron con nuestro citómetro de flujo y los resultados se procesaron con el software analítico para citometría de flujo FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, Oregón, Estados Unidos). Estos resultados demuestran que la quiescencia farmacológica ofrece protección frente al daño en el ADN inducido quimioterapéuticamente a través de farmacokuiescencia de manera dependiente de la dosis.

[0152] La inhibición de CDK4/6 protege las células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales frente a la muerte celular inducida por etopósido. En la figura 5 se demuestra que el uso de un inhibidor potente y selectivo de CDK4/6 en células no hemáticas dependientes de CDK4/6 puede ofrecer protección frente a agentes que dañan el ADN tales como, pero sin limitarse a etopósido. Las células epiteliales primarias de los túbulos proximales de riñón humano normales se sembraron y se trataron con dosis crecientes del inhibidor de CDK4/6 PD0332991, 24 horas después de la siembra. A las 16 horas del tratamiento, estas células recibieron una dosis de etopósido 2,5 μ M durante ocho horas. El medio se retiró y se sustituyó por medio fresco. Las células se mantuvieron en el cultivo durante siete días al cabo de los cuales se evaluaron con CellTiter-Glo® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), usando las especificaciones del fabricante, para determinar los efectos sobre la proliferación celular. La placa se leyó en un luminómetro a 1 segundo/pocillo. Los resultados se analizaron en Microsoft Excel. Las células tratadas con dosis crecientes de PD0332991 mostraron protección frente a la muerte celular inducida por etopósido de manera dependiente de la dosis.

[0153] El riñón es relativamente quiescente hasta que se estimula por una lesión renal. Por lo tanto, para determinar si la proliferación de células renales era dependiente de la actividad de CDK4/6 *in vivo*, se estimuló la proliferación de células renales tratando ratones hembra FVB de tipo natural con cisplatino, un agente quimioterapéutico conocido como nefrotóxico. En el momento de 0 horas, los ratones comenzaron a recibir el

alimento con 100 mg/kg de PD0332991 por día o el alimento estándar, sin el fármaco. A las 24 horas, los ratones recibieron una única dosis de cisplatino de 15 mg/kg por inyección IP y una inyección IP de 100 µg de EdU. A las 48 horas, todos los ratones recibieron una segunda dosis de 100 µg de EdU por inyección IP. Después de 72 horas, los ratones se sacrificaron y se extirparon los riñones. Se prepararon suspensiones de células renales individuales moliendo suavemente los riñones con el disociador de tejidos gentleMACS™ (Miltinyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). A continuación, las suspensiones de células individuales se usaron para medir la incorporación de EdU por análisis de citometría de flujo. Los ratones tratados con cisplatino y el vehículo como control mostraron aproximadamente el 17 % de las células marcadas con EdU, mientras que los ratones tratados con cisplatino y PD0332991 solo tenían aproximadamente el 2 % de células con tinción positiva para la incorporación de EdU. Véase la figura 6. Por lo tanto, la inhibición de CDK4/6 resultó en una reducción de la proliferación celular del 88 %, lo que confirma el análisis *in vitro* de que la proliferación celular depende de la actividad de CDK4/6.

[0154] Para determinar si la inhibición de CDK4/6 aproximadamente en el momento del daño al ADN protegería la función renal, los ratones se trataron con cisplatino, un agente conocido causante de daño en los túbulos renales en humanos. Los ratones se trataron con 150 mg/kg de PD0332991 o con el vehículo como control por vía oral y después recibieron una dosis única de 15 mg/kg de cisplatino por inyección IP. A las 72 horas después del tratamiento, los ratones se sacrificaron y se extrajo sangre por punción cardíaca para analizar el NUS (nitrógeno ureico sanguíneo) y la creatinina sérica (CrSr). El NUS sérico y la CrSr son marcadores comunes de la función renal y los niveles séricos aumentan rápidamente cuando dicha función renal está gravemente afectada. La figura 7 muestra un aumento considerable de NUS y CrSr después de la administración de cisplatino y una dosis única de PD0332991 coadministrada con el cisplatino fue capaz de anular la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino.

[0155] CDK4/6 parece desempeñar un papel en la proliferación celular de ciertos tejidos no hemáticos como el riñón. Así, los inhibidores de CDK4/6 pueden usarse para proteger tejidos no hemáticos, tales como, pero sin limitarse al riñón, intestino, corazón, hígado, cerebro, tiroides, piel, mucosa intestinal, sistema auditivo, pulmón, vejiga, ovarios, útero, testículos, glándulas suprarrenales, vesícula biliar, páncreas e islotes pancreáticos, estómago, vasos sanguíneos y hueso frente a los agentes que dañan el ADN como la radiación y la quimioterapia.

Ejemplo 5 (ejemplo de referencia)

Aumento de la eficacia del agente que daña el ADN por la inhibición de CDK4/6

[0156] Se evaluaron los efectos proliferativos de la inhibición de CDK4/6 sobre un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón microcítico (CPM) con RB intacta (H417) o deficientes en RB (H69, H82, H209, H345). Las células se trataron con DMSO o PD0332991 100 nM durante 48 horas y entonces se estimó el número de células mediante el ensayo de WST-1, una medida de la respiración celular. Véase la figura 8. En la línea celular de CPM con RB intacta (H417), la proliferación celular disminuyó, mientras que en las cuatro líneas deficientes en RB, la proliferación celular aumentó de hecho por la inhibición de CDK4/6.

[0157] También se evaluaron los efectos de la inhibición de CDK4/6 en el modelo de ratones transgénicos C3-TAg de cáncer de mama de tipo basal. El modelo C3-TAg contiene un gen recombinante que expresa la secuencia transformante de la región temprana del virus del simio 40 (antígeno T mayor de SV40), que se ha demostrado que inactiva p53 y RB. Los ratones se alojaron a una densidad de cinco por jaula con acceso a voluntad al alimento estándar y el agua. El volumen tumoral se midió semanalmente con un calibrador. El volumen tumoral se calculó con la fórmula siguiente: $volumen = [(ancho)^2 \times largo]/2$. Después de haberse establecido un volumen suficiente (50-60 mm³), los ratones se estratificaron por el tamaño tumoral y se asignaron aleatoriamente a cada una de las cohortes del estudio (sin tratar, 100 mg/kg de PD0332991 diarios en el alimento estándar, quimioterapia más el vehículo como control una vez a la semana durante tres semanas o quimioterapia y PD0332991 una vez a la semana durante tres semanas). En las cohortes de tratamiento una vez a la semana durante tres semanas, la quimioterapia se administró por inyección IP y los 150 mg/kg de PD0332991 o el vehículo como control se administraron por vía oral. El régimen de quimioterapia constó de 75 mg/kg de carboplatino una vez a la semana durante tres semanas. Los tratamientos se administraron los días 0, 7 y 14 y los volúmenes tumorales se midieron semanalmente hasta que los ratones murieron o se sacrificaron debido a la toxicidad o a la carga tumoral.

[0158] La administración diaria del inhibidor de CDK4/6, PD0332991, no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral en el modelo C3-TAg el día 21 (véase la figura 9), mientras que la coadministración de 150 mg/kg de PD0332991 con 75 mg/kg de carboplatino una vez a la semana durante tres semanas resultó en un aumento de la respuesta tumoral en los ratones C3-TAg (figura 9). Además, el seguimiento a largo plazo de los ratones C3-TAg mostró que la progresión tumoral se retrasó en la cohorte de PD0332991/carboplatino en comparación con la

cohorte de control/carboplatino (figura 10). En conjunto, estos datos sugieren que, en el tratamiento de tumores con graves trastornos del ciclo celular, la inhibición de CDK4/6 puede aumentar la eficacia de la quimioterapia.

[0159] Por consiguiente, parece que la inhibición de CDK4/6 puede aumentar la eficacia de los agentes que dañan el ADN en el tratamiento de ciertos cánceres con graves alteraciones del ciclo celular, por ejemplo, cánceres caracterizados por niveles muy altos de actividad de CDK2 (por ejemplo, como resultado de la amplificación del protooncogén MYC) o pérdidas de la proteína supresora tumoral RB. En tales tumores, los inhibidores de CDK4/6 no inducen quiescencia farmacológica en las células tumorales, sino que más bien aumentan la sensibilidad del cáncer a los agentes que dañan el ADN, con lo que aumentan la destrucción tumoral. El tratamiento con inhibidores de CDK4/6 previene a la vez la toxicidad hemática en el huésped de los agentes que dañan el ADN (a través de la inducción de quiescencia en ciertas otras células). Este aumento de la destrucción tumoral en cánceres nulos para RB o con MYC amplificado, combinado con la disminución de la toxicidad en el huésped significa una ampliación de la ventana terapéutica de tales tumores, lo que permite curar más fácilmente estos tumores con menos toxicidad para el paciente.

[0160] Se espera que un subconjunto de tipos tumorales, como los cánceres de mama con Her2 amplificado, sean sensibles a la inhibición de CDK4/6 y, por tanto, la coadministración de inhibidores de CDK4/6 con la quimioterapia resulte probablemente en protección frente a los tumores. Sin embargo, la mayoría de los cánceres usan las cinasas proliferativas promiscuamente (por ejemplo, pueden usar CDK1/2/4 o 6). Por consiguiente, la inhibición aislada de CDK4/6 no debe afectar al crecimiento tumoral en la mayoría de los cánceres y la inhibición de CDK4/6 no afectará negativamente a la eficacia de la quimioterapia en estos tipos tumorales. De hecho, según se señala anteriormente, se espera que la inhibición de CDK4/6 con moléculas pequeñas inhibitoras selectivas aumente la eficacia de los agentes quimioterapéuticos en ciertos tumores que no dependen de CDK4/6. Como entenderá un experto en la técnica, tales tumores pueden deducirse a partir del tipo de tumor y la genética molecular y, por ejemplo, pueden ser cánceres caracterizados por uno o más del grupo que incluye, pero no se limita a un aumento de la actividad de CDK1 o CDK2, pérdida o ausencia de la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (RB), altos niveles de expresión de MYC, aumento de la ciclina E y aumento de la ciclina A. Tales cánceres pueden incluir, pero no se limitan al cáncer de pulmón microcítico, retinoblastoma, cánceres positivos para VPH como el cáncer cervical y ciertos cánceres de cabeza y cuello, tumores con MYC amplificado como el linfoma de Burkitts y el cáncer de mama triple negativo; ciertas clases de sarcoma, ciertas clases de carcinoma de pulmón no microcítico, ciertas clases de melanoma, ciertas clases de cáncer pancreático, ciertas clases de leucemia, ciertas clases de linfoma, ciertas clases de cáncer cerebral, ciertas clases de cáncer de colon, ciertas clases de cáncer de próstata, ciertas clases de cáncer ovárico, ciertas clases de cáncer uterino, ciertas clases de cáncer de tiroides y otros cánceres de tejido endocrino, ciertas clases de cánceres salivales, ciertas clases de carcinomas tímicos, ciertas clases de cánceres de riñón, ciertas clases de cánceres de vejiga y ciertas clases de cánceres testiculares.

[0161] En ejemplos no limitantes, el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón microcítico, retinoblastoma y cáncer de mama triple negativo (negativo para ER/PR/Her2) o "de tipo basal". El cáncer de pulmón microcítico y el retinoblastoma casi siempre inactivan la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (RB) y, por consiguiente, no requieren la actividad de CDK4/6 para su proliferación. Por tanto, el tratamiento con un inhibidor de CDK4/6 producirá quiescencia farmacológica en la médula ósea y otras células normales del huésped, pero no en el tumor. El cáncer de mama triple negativo (de tipo basal) también es casi siempre nulo para RB. Además, ciertos cánceres inducidos por virus (por ejemplo, el cáncer cervical y algunos cánceres de cabeza y cuello) expresan una proteína vírica (E7) que inactiva RB, lo que hace que estos tumores sean funcionalmente nulos para RB. También se piensa que algunos cánceres de pulmón están causados por el VPH. Como entenderá un experto en la técnica, los cánceres de los que no se espera que sean afectados por los inhibidores de CDK4/6 (por ejemplo, aquellos que son nulos para RB, que expresan la proteína vírica E7 o que sobreexpresan MYC) pueden determinarse por procedimientos que incluyen, pero no se limitan al análisis de ADN, inmunotinción, análisis de inmunotransferencia y determinación de perfiles de expresión génica.

Ejemplo 6 (ejemplo de referencia)

Bloqueo de la proliferación de linfocitos T por la inhibición de CDK4/6

[0162] La inhibición farmacológica aguda de CDK4/6 inhibe la proliferación de linfocitos con el efecto más pronunciado sobre la proliferación homeostática de linfocitos T de memoria y la formación de centros germinales en ratones. Para determinar si la inhibición de CDK4/6 afecta a la generación y mantenimiento de los linfocitos de memoria, se trataron ratones con inhibidores selectivos de CDK4/6, PD0332991 o un inhibidor selectivo de CDK4/6 no relacionado, 2BrIC. El compuesto 2BrIC fue sintetizado por OTAVA Chemicals (Kiev, Ucrania) y puede

prepararse de acuerdo con los procedimientos descritos en Zhu y col., J. Med. Chem. 46, 2027-2030 (2003). La inhibición aguda de CDK4/6 por PD0332991 o 2BrIC resultó en una disminución más significativa de la proliferación homeostática de los linfocitos T de memoria que de los linfocitos T vírgenes, según se determina por la incorporación de BrdU y la expresión de Ki67 en células humanas y murinas. Véanse las figuras 11, 17, 18 y 21. En la figura 11A, un efecto de PD0332991 en la incorporación de BrdU *in vivo* en linfocitos T murinos CD4+ y CD8+, en que los mayores efectos se observan en los linfocitos de memoria CD44+ CD25+ (cuantificado en la figura 11B). Un efecto similar sobre la proliferación homeostática *in vivo* se observó en linfocitos T esplénicos no estimulados mediante tinción con Ki67 (figura 21). La disminución de la actividad de CDK4/6 también inhibió la formación de centros germinales, lo que es importante para la generación de linfocitos B de memoria. Véase la figura 11C. Estos datos revelan un papel para CDK4/6 en la homeostasis de los linfocitos de memoria.

[0163] Usando linfocitos humanos se observaron resultados similares. La figura 12 muestra un esquema experimental para estudiar aspectos similares en humanos. Los linfocitos humanos se separan en linfocitos T(CD3+) y B(CD19+) y se tratan *in vitro* con un inhibidor de CDK4/6 antes de su estimulación con PMA e ionomicina (P+I) + células OKT3 (linfocitos T) o IgM (linfocitos B), en que la proliferación se determina por la incorporación de BrdU y la expresión de Ki67 y la activación se determina por la expresión de CD25. La figura 13 muestra que, al igual que en células murinas, los inhibidores de CDK4/6 bloquean la proliferación en respuesta a la estimulación (P+I) de los receptores de linfocitos T (TCR), con un efecto mayor en los linfocitos de memoria CD45RA^{low}. Estos datos se representan en la figura 14. En la figura 15, se evalúan los efectos de la inhibición de CDK4/6 sobre fracciones de linfocitos T específicas, con y sin TCR, y se muestra que la inhibición de CDK4/6 tiene un efecto mayor sobre la proliferación de los linfocitos de memoria en relación con los linfocitos vírgenes. Un efecto similar se observó en los linfocitos CD8+. La figura 16 muestra datos similares a los de la figura 15, pero con el uso de Ki67 como marcador de proliferación en lugar de BrdU. Estos efectos sobre la proliferación cambian las frecuencias relativas de los linfocitos CD4+ (véanse las figuras 17A, 17B y 17C) y CD8+ (véase la figura 18). Los inhibidores de CDK4/6 disminuyen la frecuencia de linfocitos de memoria efectoros (ME) CD4+ en mayor medida que los linfocitos vírgenes. Véanse las figuras 17A y 17C. Un resultado similar se observa en los linfocitos CD8+. Como resultados de estos efectos sobre la proliferación, la relación memoria/virgen disminuyó a la mitad en los dos compartimentos de CD4+ y CD8+. Véanse las figuras 17B y 20. Estas alteraciones de la proliferación están asociadas con una disminución de la activación de los linfocitos T, según se determina por la expresión de CD25. Véase la figura 19.

[0164] Esta capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T puede usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas. Actualmente, estas enfermedades se tratan con diversos agentes citotóxicos y esteroides de toxicidad significativa. Ha resultado difícil dirigirse específicamente al compartimento de linfocitos T de memoria para atenuar las respuestas inmunitarias de recuerdo y el uso de los inhibidores de CDK4/6 para reducir la proliferación de esta fracción será especialmente útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas.

[0165] Diferenciación de timocitos: Se evaluó el efecto de la inhibición de CDK4/6 sobre el desarrollo de los timocitos mediante la determinación de los porcentajes y los números absolutos de timocitos en los diferentes estados (doble negativo (DN): CD4- CD8-; doble positivo (DP): CD4+ CD8+; simple positivo (SP): CD4+ o CD8+) por FACS. Las células DN se convierten en células DP que a su vez se convierten en células solo positivas para CD4 o CD8. La inhibición transitoria de CDK4/6 produjo una reducción considerable de las células DP y SP, sin afectar relativamente a las células DN. Este resultado sugiere que se requiere la activación de CDK4/6 durante la timopoyesis para la producción de nuevos linfocitos T vírgenes. Véase la figura 23.

Ejemplo 7 (ejemplo de referencia)

Bloqueo de la proliferación de linfocitos B por la inhibición de CDK4/6

[0166] Se trataron cohortes de ratones de tipo natural con el vehículo o con un inhibidor de CDK4/6 como en la figura 11. La tinción mediante Ki67 de un centro germinal en un ganglio linfático muestra una notable disminución de la proliferación con la inhibición de CDK4/6. Un resultado similar se observó en linfocitos B CD45R+ esplénicos. Véase la figura 21. Los ratones no estimulados se trataron durante 24 horas con PD0332991 y la proliferación homeostática de los linfocitos B se determinó por tinción con Ki67, después de la separación apropiada. Al usar la incorporación de BrdU para medir la proliferación de linfocitos B esplénicos se obtuvieron resultados similares. Véase la figura 22. Se llevaron a cabo experimentos similares en células humanas con estimulación de receptores de linfocitos B, según se describe en la figura 12. La figura 20 muestra que la inhibición de CDK4/6 bloquea la estimulación de linfocitos B por P+I. Estos resultados demuestran que la proliferación homeostática del centro germinal y de linfocitos B inducida por BCR requiere la actividad de CDK4/6 en ratones y en humanos.

Ejemplo 8 (ejemplo de referencia)

Inhibición de la aparición de enfermedades inmunitarias por la inhibición de CDK4/6

5

[0167] Se han desarrollado varias líneas de modelos de ratones autoinmunes, incluidos los ratones NOD (diabetes autoinmunitaria espontánea) y Lyn^{-/-} (enfermedad autoinmunitaria similar al lupus). Véase, por ejemplo Anderson y Bluestone, Annual Review of Immunology 23, 447-485 (2005); y Hibbs y col., Cell 83, 301-311 (1995).

10 un inhibidor de CDK4/6 durante periodos definidos de tiempo antes de analizar la presencia de fenotipos autoinmunes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor que inhibe selectivamente la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y/o la cinasa dependiente de ciclina 6 (CDK6) para uso en un procedimiento para aumentar la eficacia de los factores de crecimiento para el rescate y apoyo de las poblaciones de células hematopoyéticas en un sujeto que recibe un tratamiento contra el cáncer para un cáncer que no depende de las actividades de CDK4/6 para su proliferación, en que dicho procedimiento comprende (i) la administración a un sujeto de una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto inhibidor, (ii) la exposición de dicho sujeto a un agente que daña el ADN para el tratamiento del cáncer y (iii) la administración de un factor de crecimiento para el rescate y apoyo de la población de células hematopoyéticas.
2. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que el factor de crecimiento comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consta de un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), un G-CSF pegilado, un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), trombopoyetina, eritropoyetina, eritropoyetina pegilada, interleucina (IL) 12, el factor acero y un factor de crecimiento de queratinocitos
3. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que el agente que daña el ADN es un agente quimioterapéutico.
4. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que el agente que daña el ADN es radiación ionizante.
5. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 2, en que el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consta de eritropoyetina y eritropoyetina pegilada.
6. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 2, en que el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consta del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) pegilado.
7. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 2, en que el factor de crecimiento es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
8. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que el factor de crecimiento se administra al menos aproximadamente 24 horas después de la administración del agente que daña el ADN o en que el factor de crecimiento se administra al menos 72 horas después de la administración del agente que daña el ADN.
9. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que dicho sujeto (i) recibe una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto inhibidor, después de la administración del compuesto inhibidor, el sujeto (ii) se expone a un agente que daña el ADN para el tratamiento del cáncer y, después de la administración del compuesto inhibidor, el sujeto (iii) recibe un factor de crecimiento para el rescate y apoyo de la población de la población de células hematopoyéticas.
10. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que la población de células hematopoyéticas son glóbulos rojos.
11. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que la población de células hematopoyéticas son glóbulos blancos.
12. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 11, en que los glóbulos blancos son linfocitos.
13. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que la población de células hematopoyéticas son plaquetas.
14. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 1, en que el compuesto inhibidor se selecciona del grupo que consta de pirido[2,3-d]pirimidinas, aril[a]pirrol[3,4-d]carbazoles, ureas sustituidas con heteroarilo que contiene nitrógeno, 5-pirimidinil-2-aminotiazoles, benzotiadiazinas,

acridinonas e isoquinolonas.

15. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 14, en que la pirido[2,3-d]pirimidina es 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-ilpiridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3d]pirimidin-7-ona.

16. La composición farmacéutica para uso en un procedimiento de la reivindicación 14, en que el aril[a]pirrol[3,4-c]carbazol es 2-bromo-12,13-dihidro-5H-indol[2,3-a]pirrol[3,4]carbazol-5,6-diona.

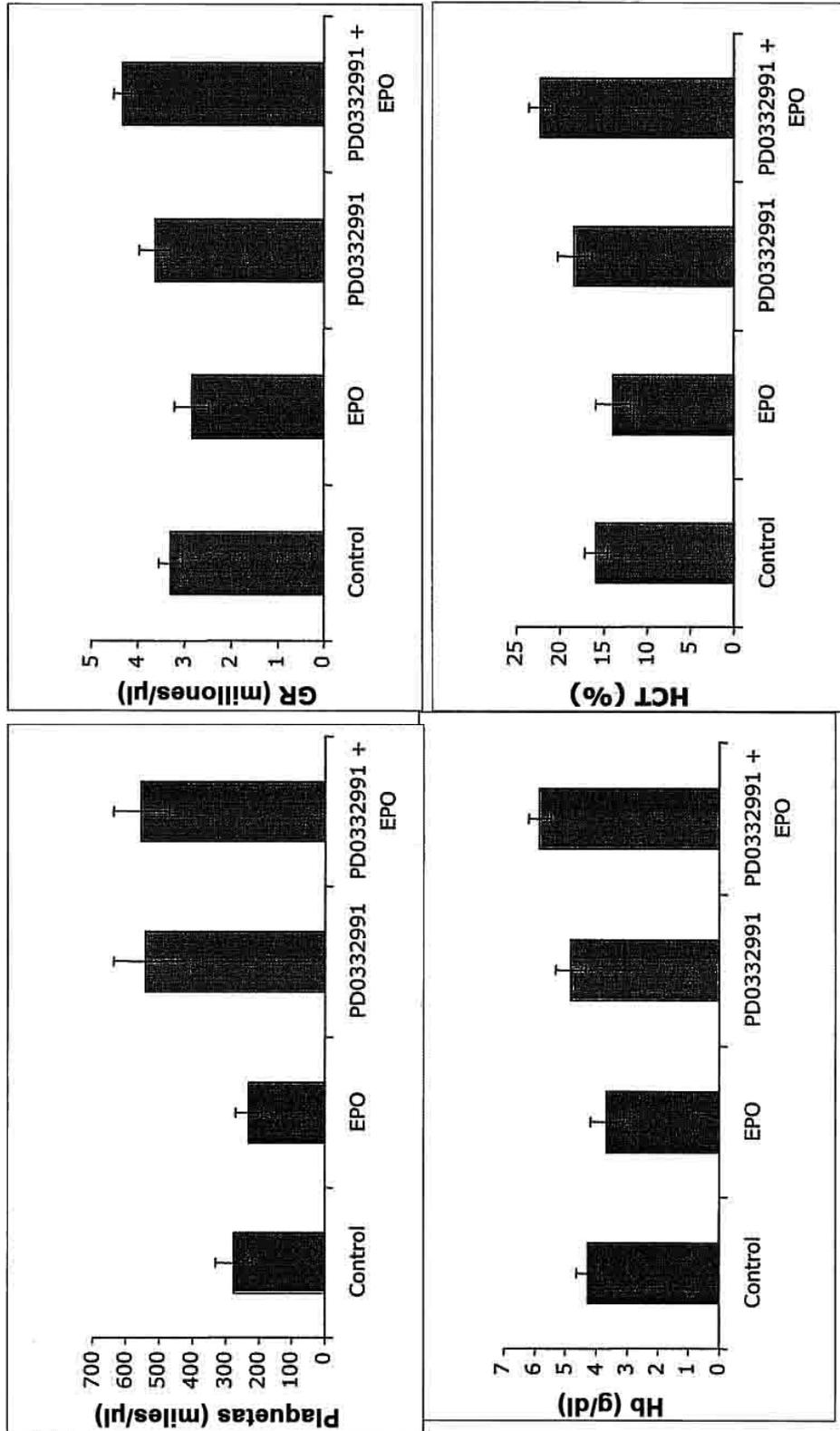


FIG. 1

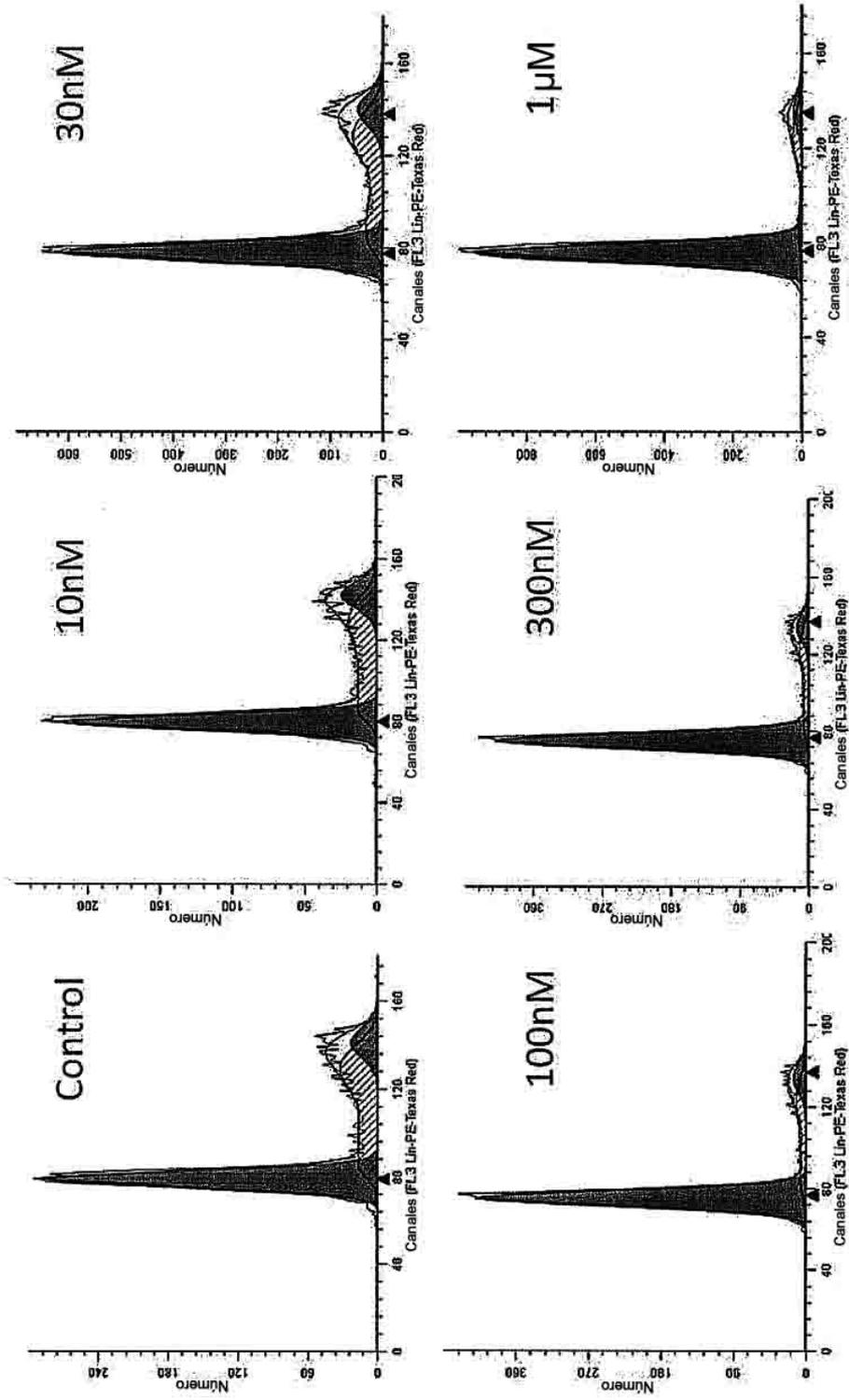


FIG. 2A

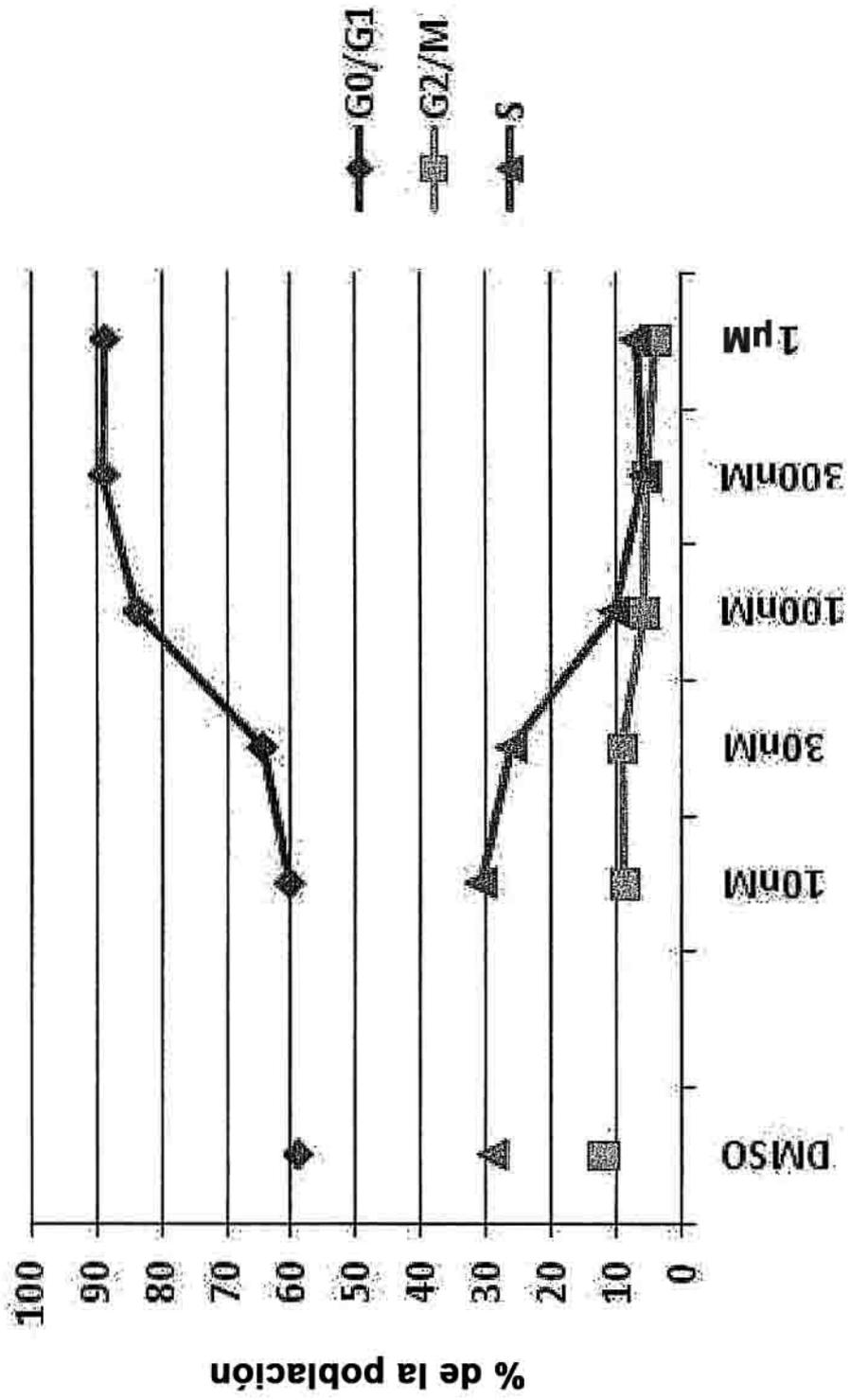


FIG. 2B

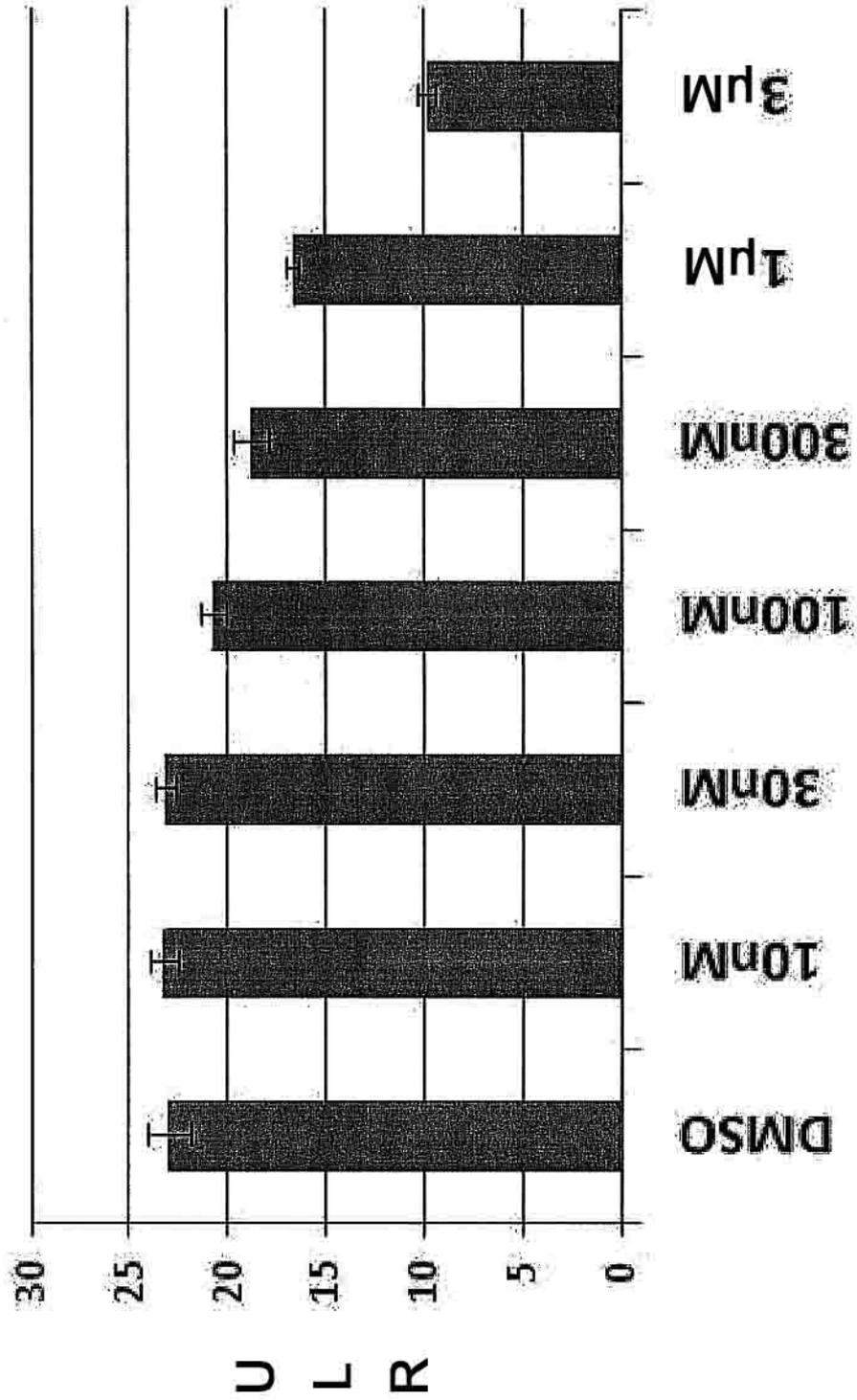


FIG. 3

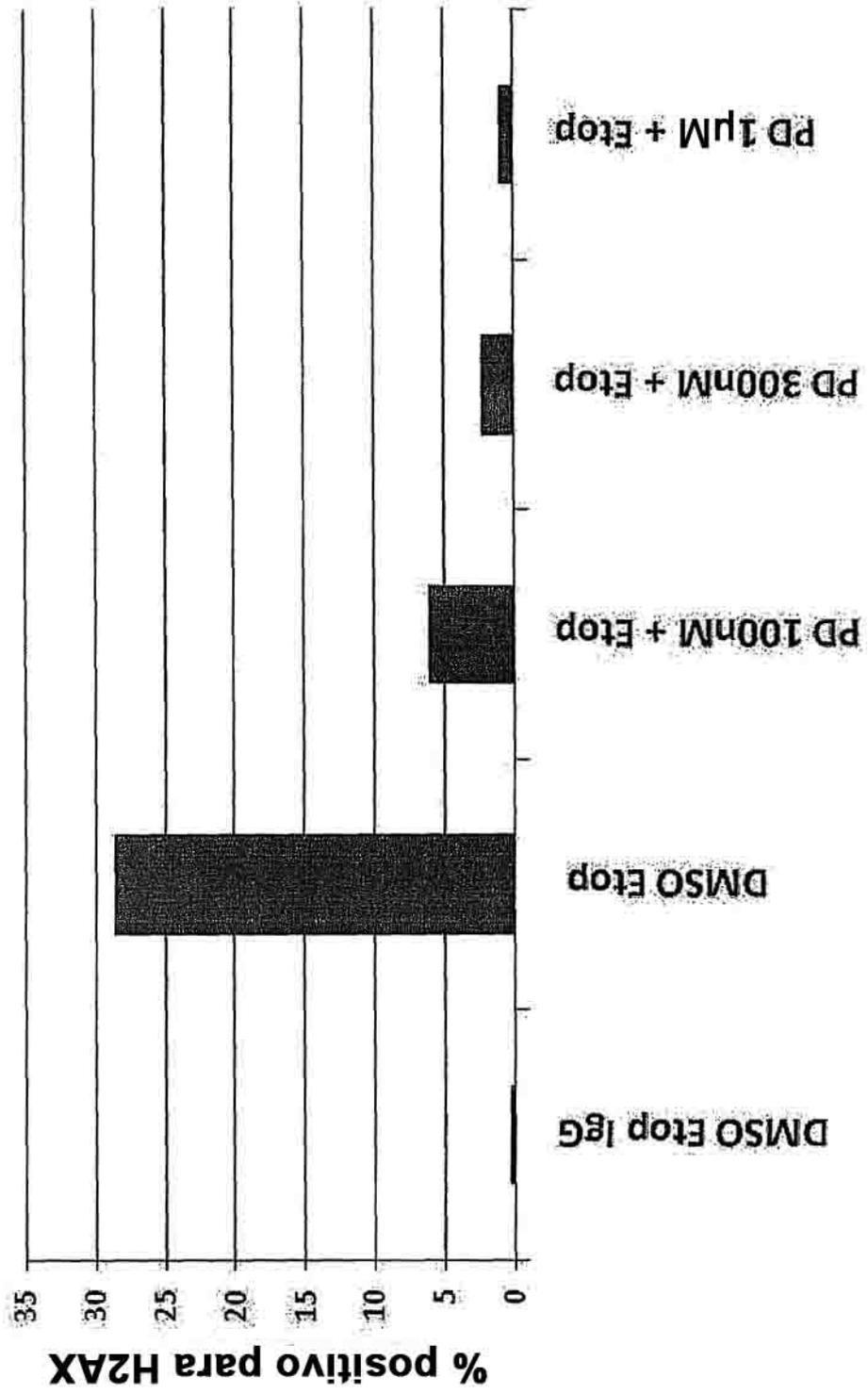


FIG. 4

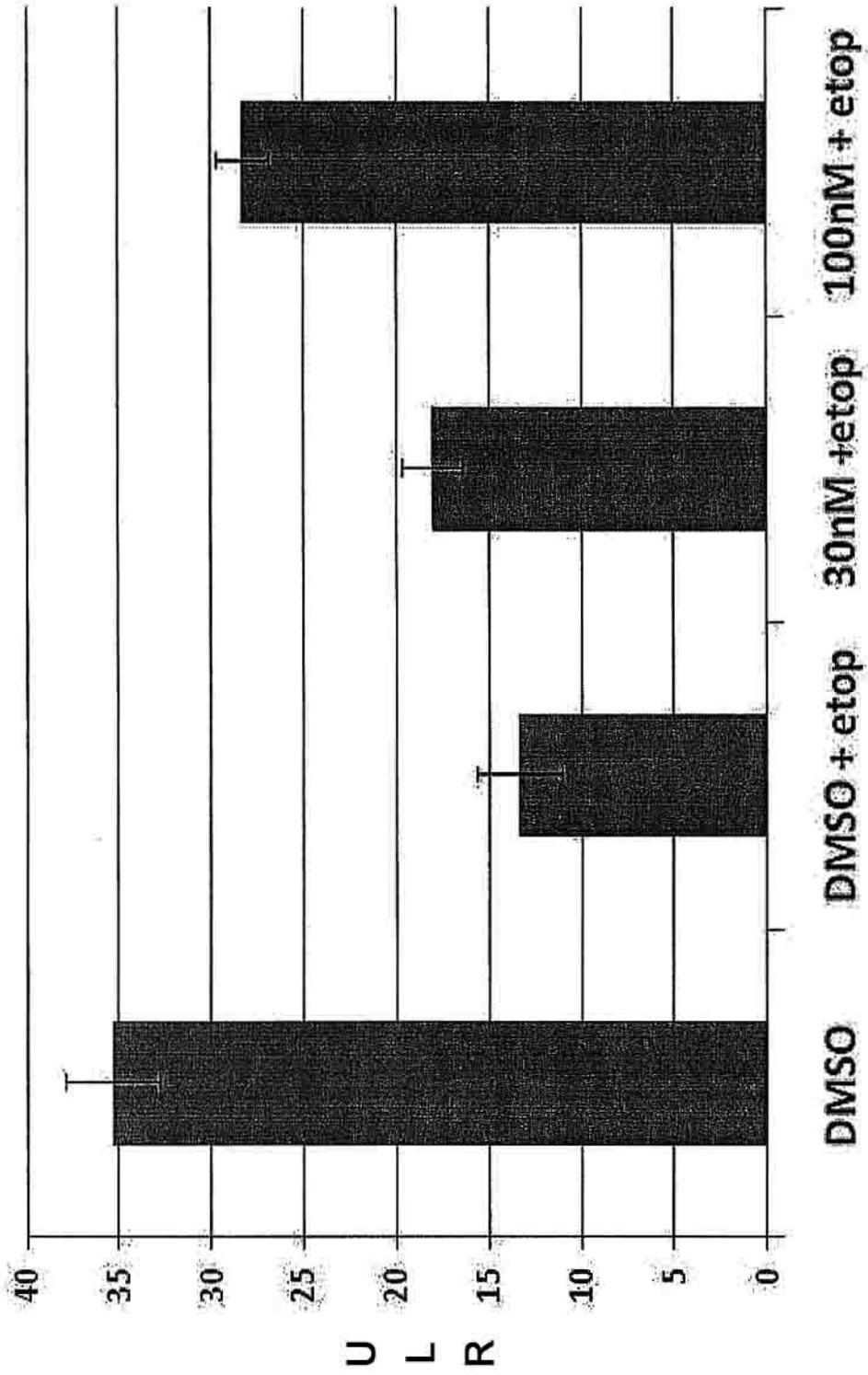


FIG. 5

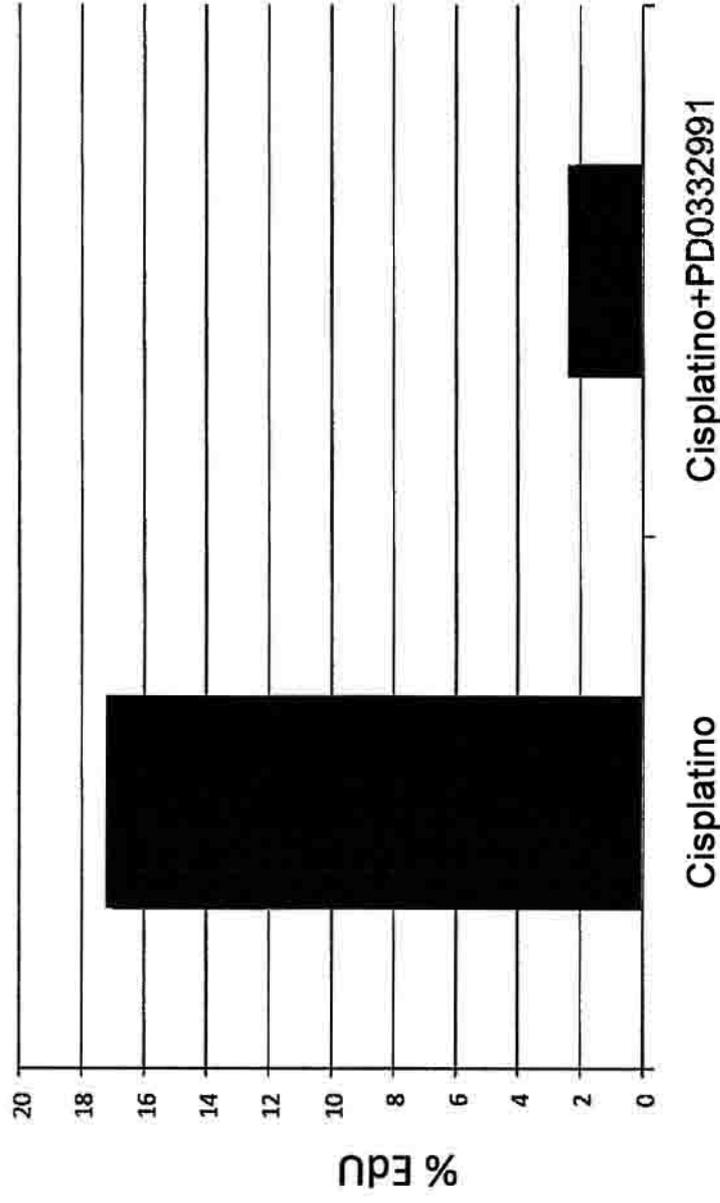


FIG. 6

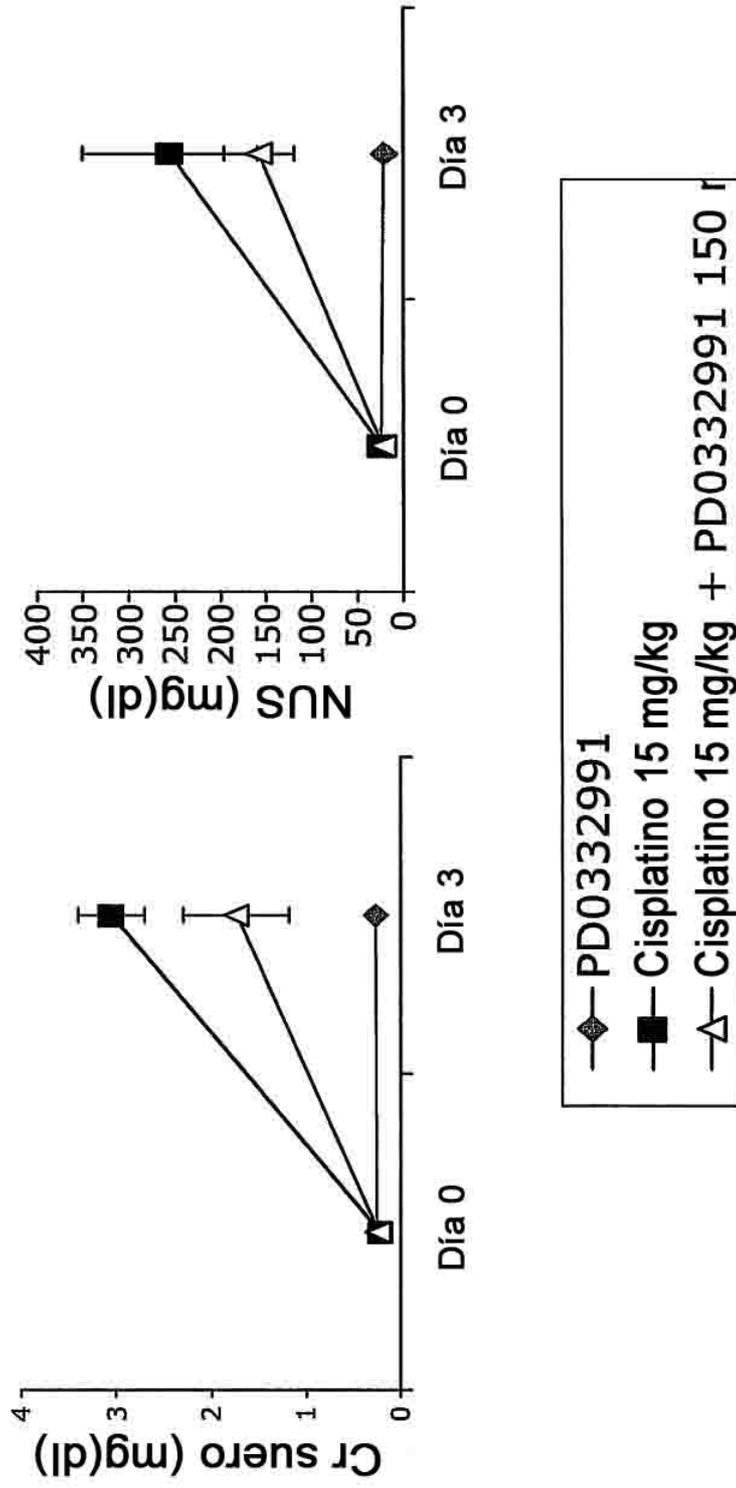


FIG. 7

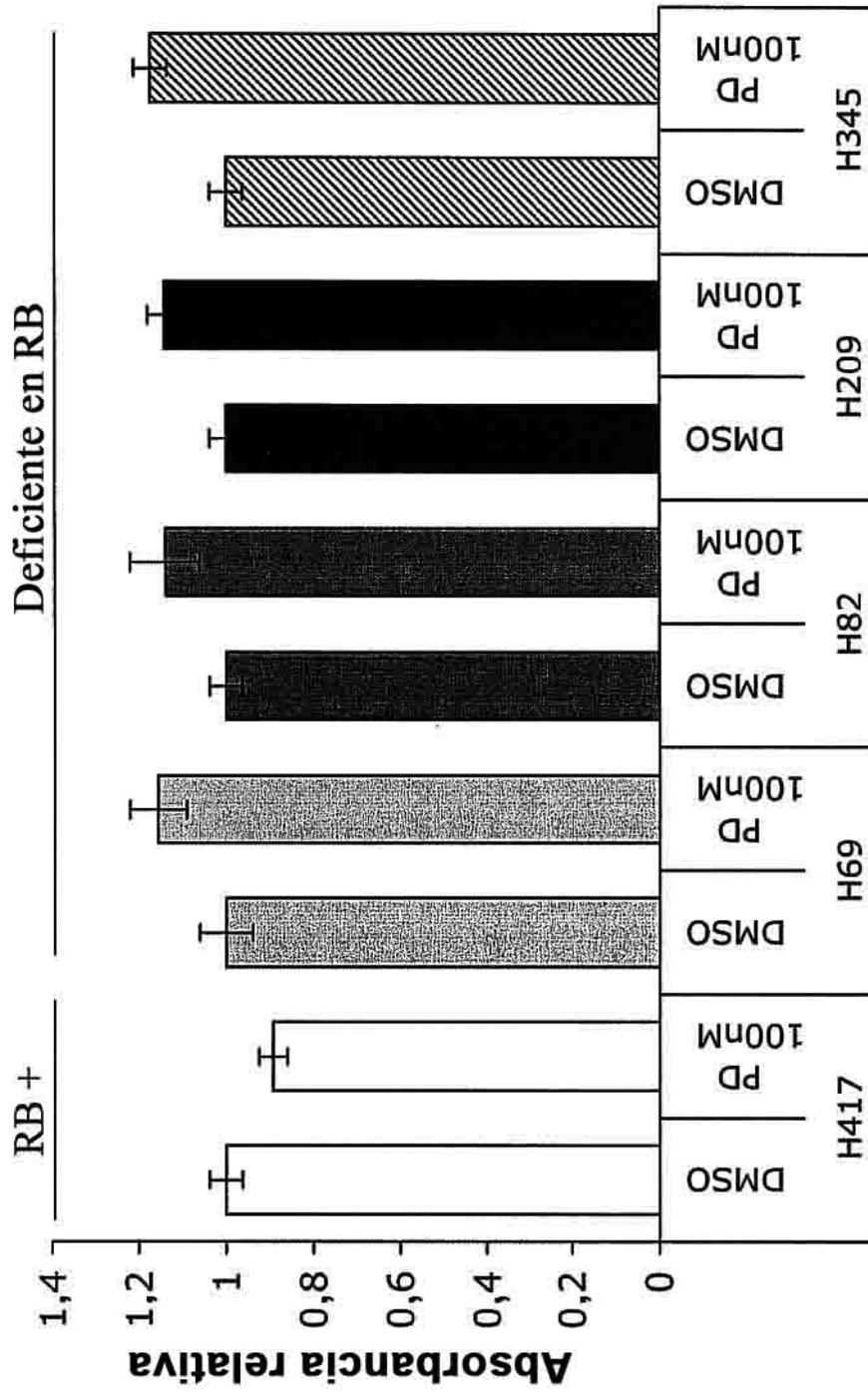


FIG. 8

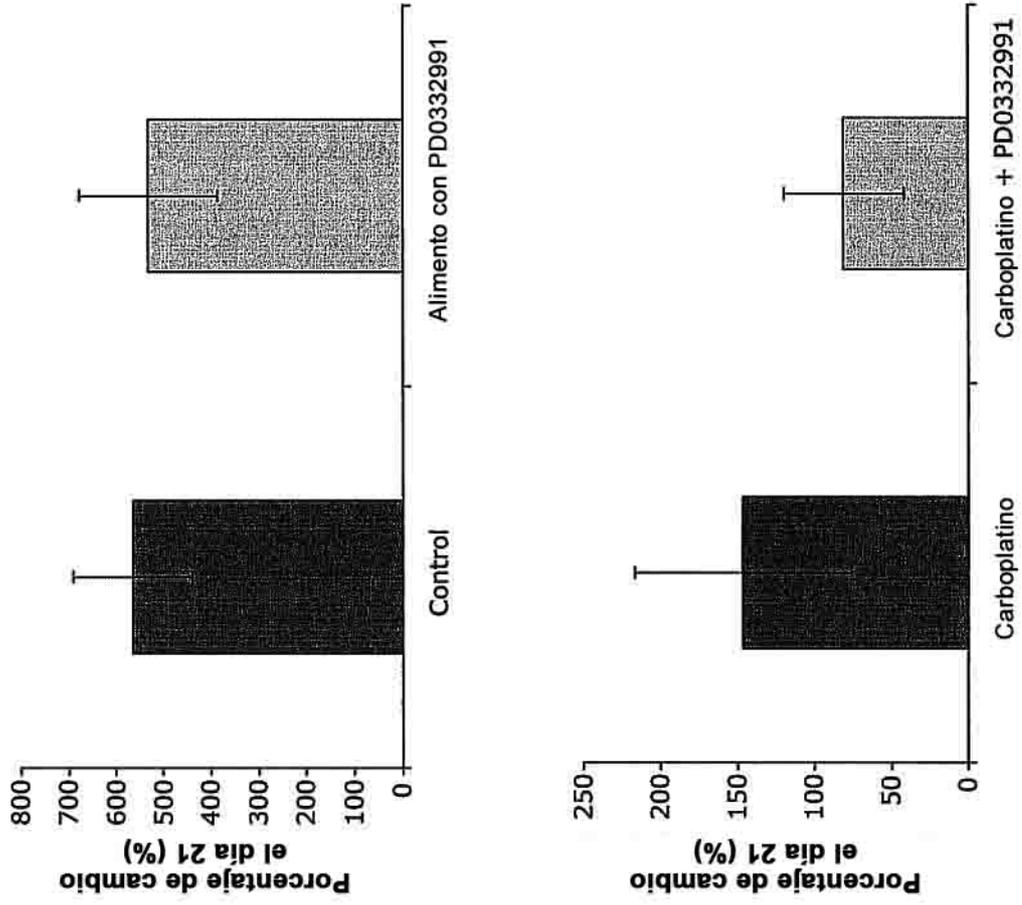


FIG. 9

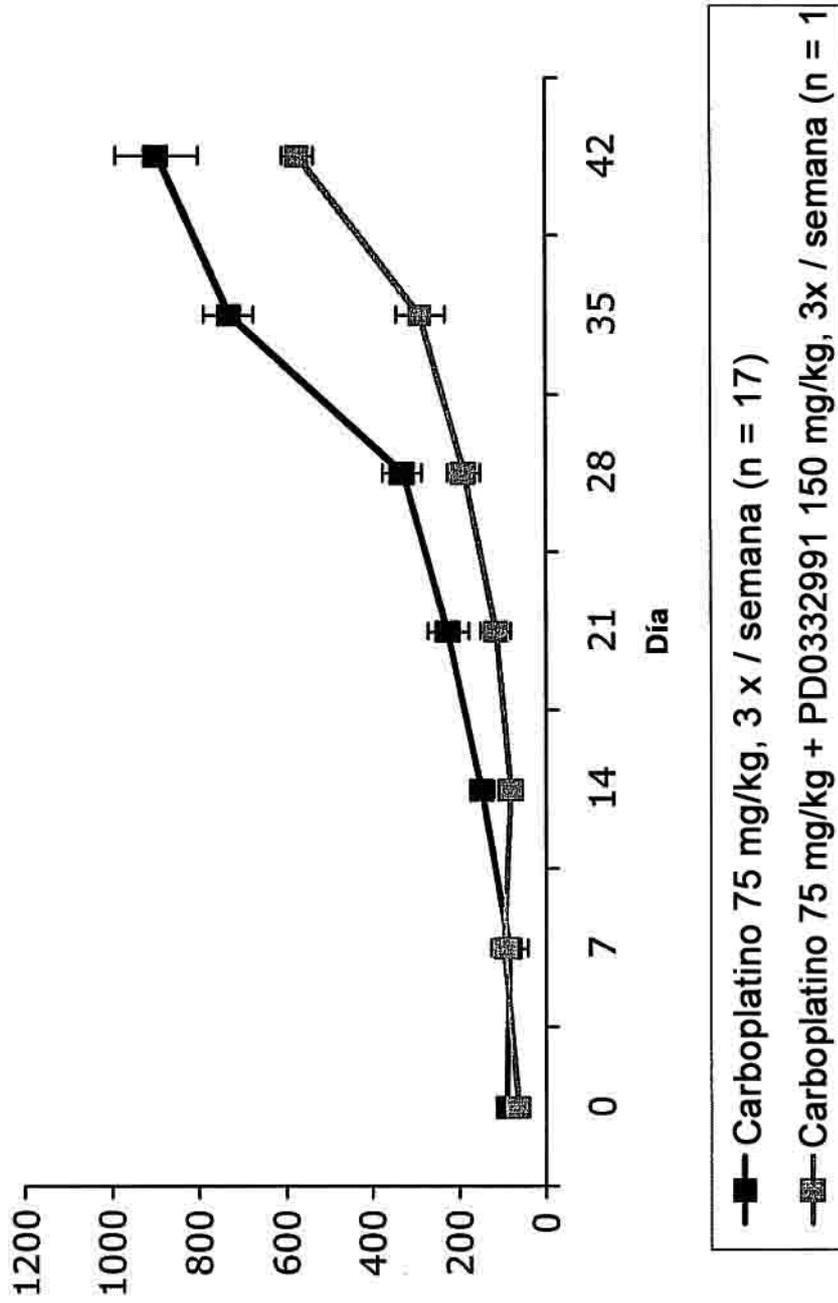


FIG. 10

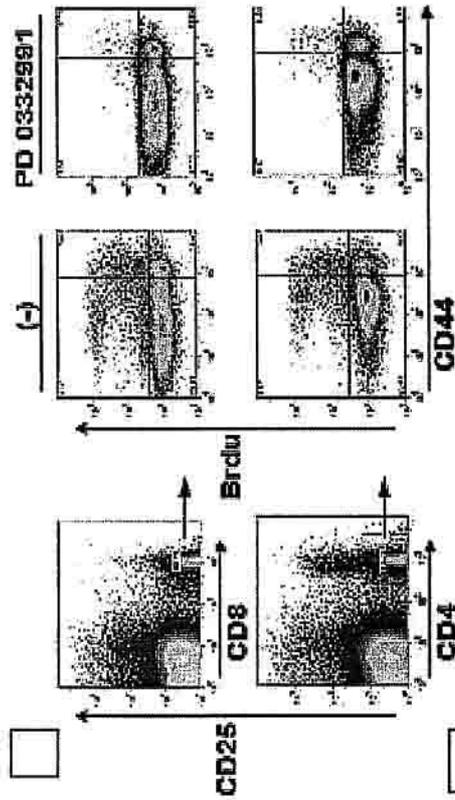


FIG. 11A

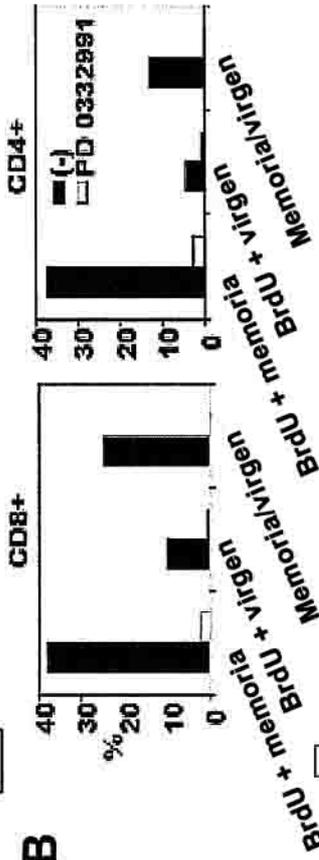


FIG. 11B

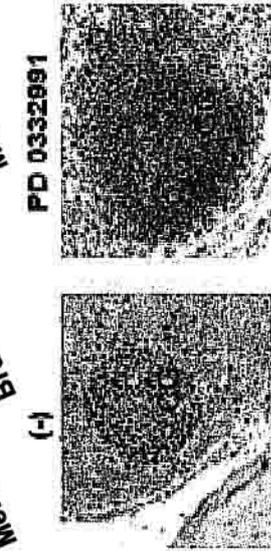


FIG. 11C

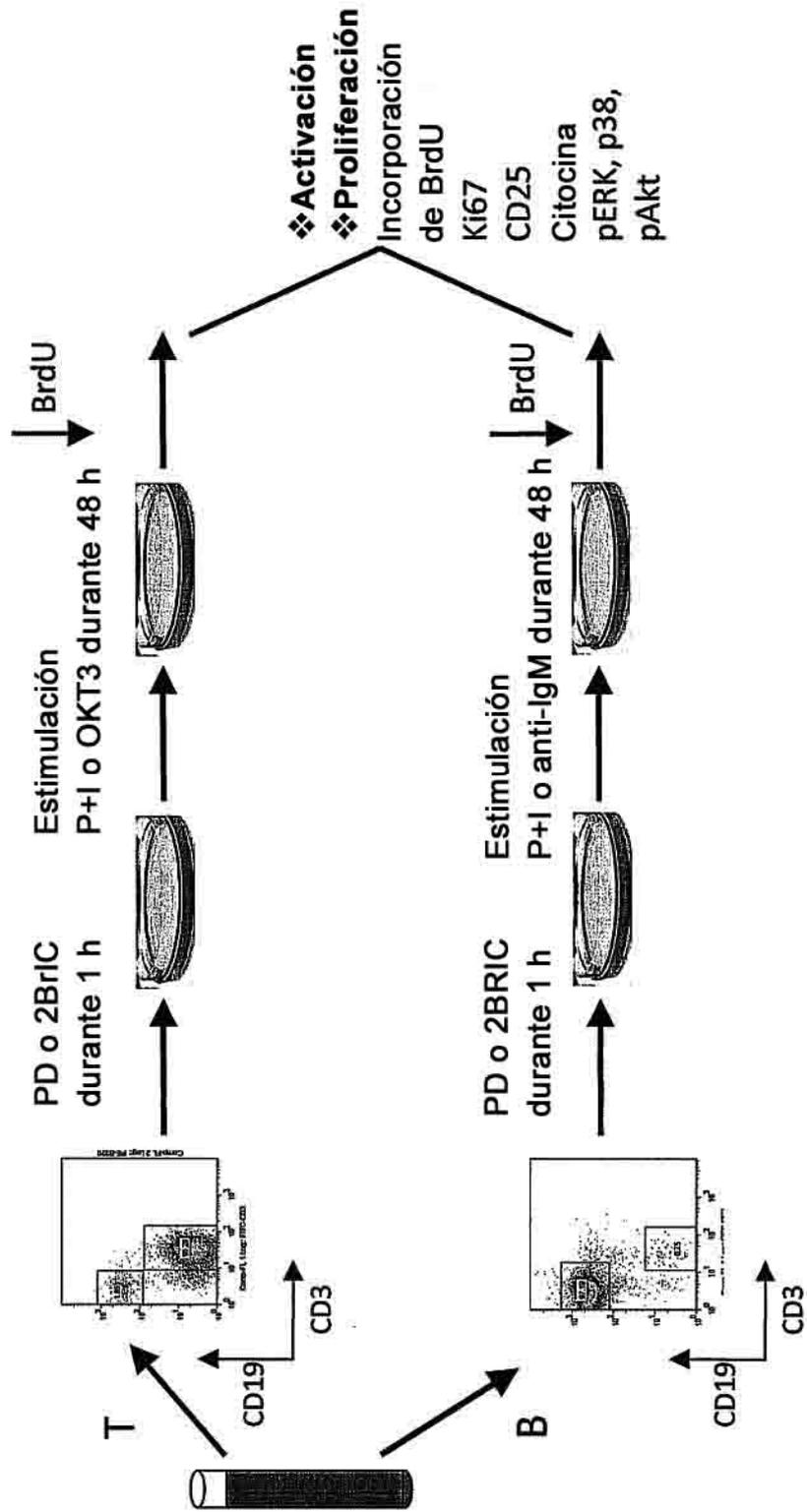
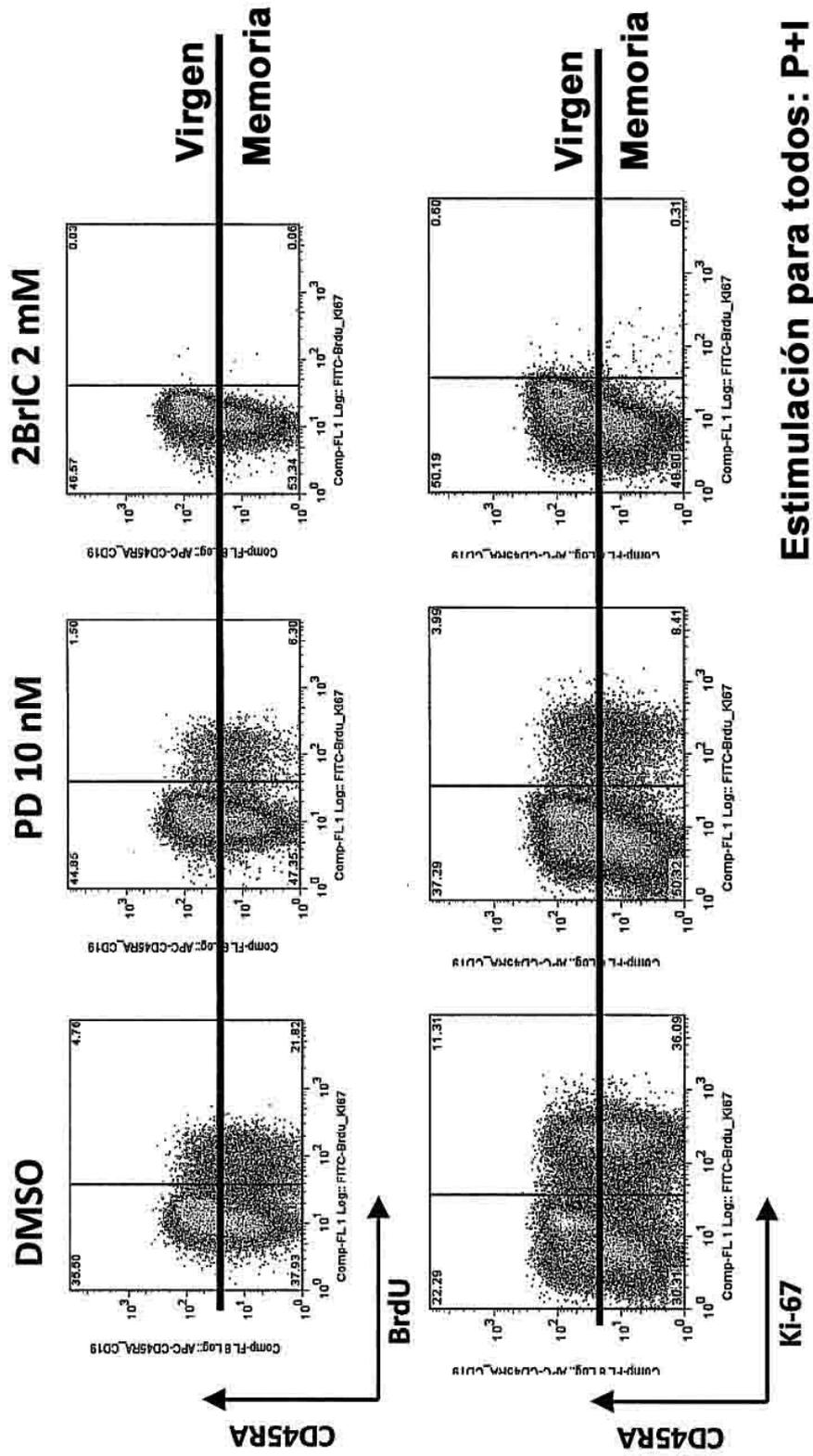


FIG. 12



Estimulación para todos: P+I

FIG. 13

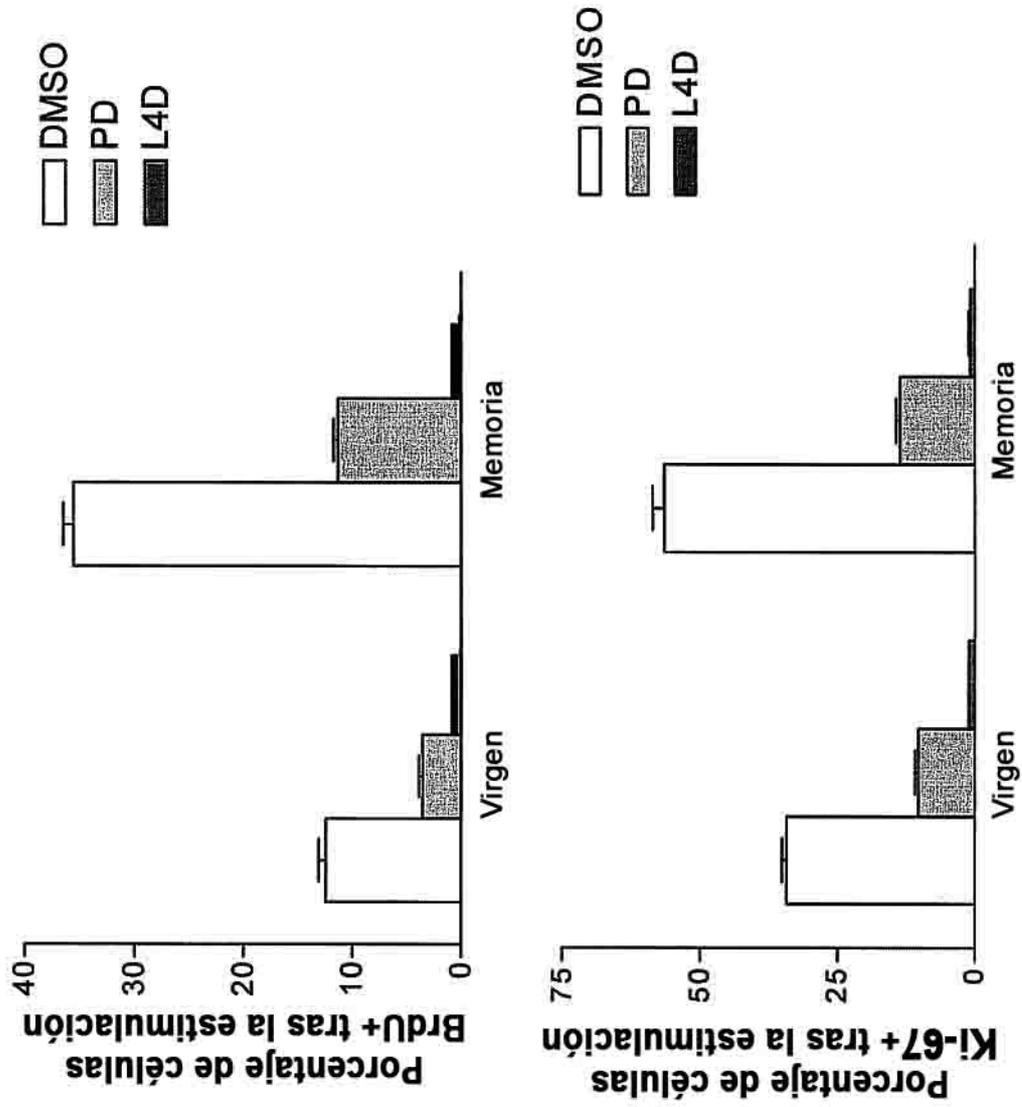
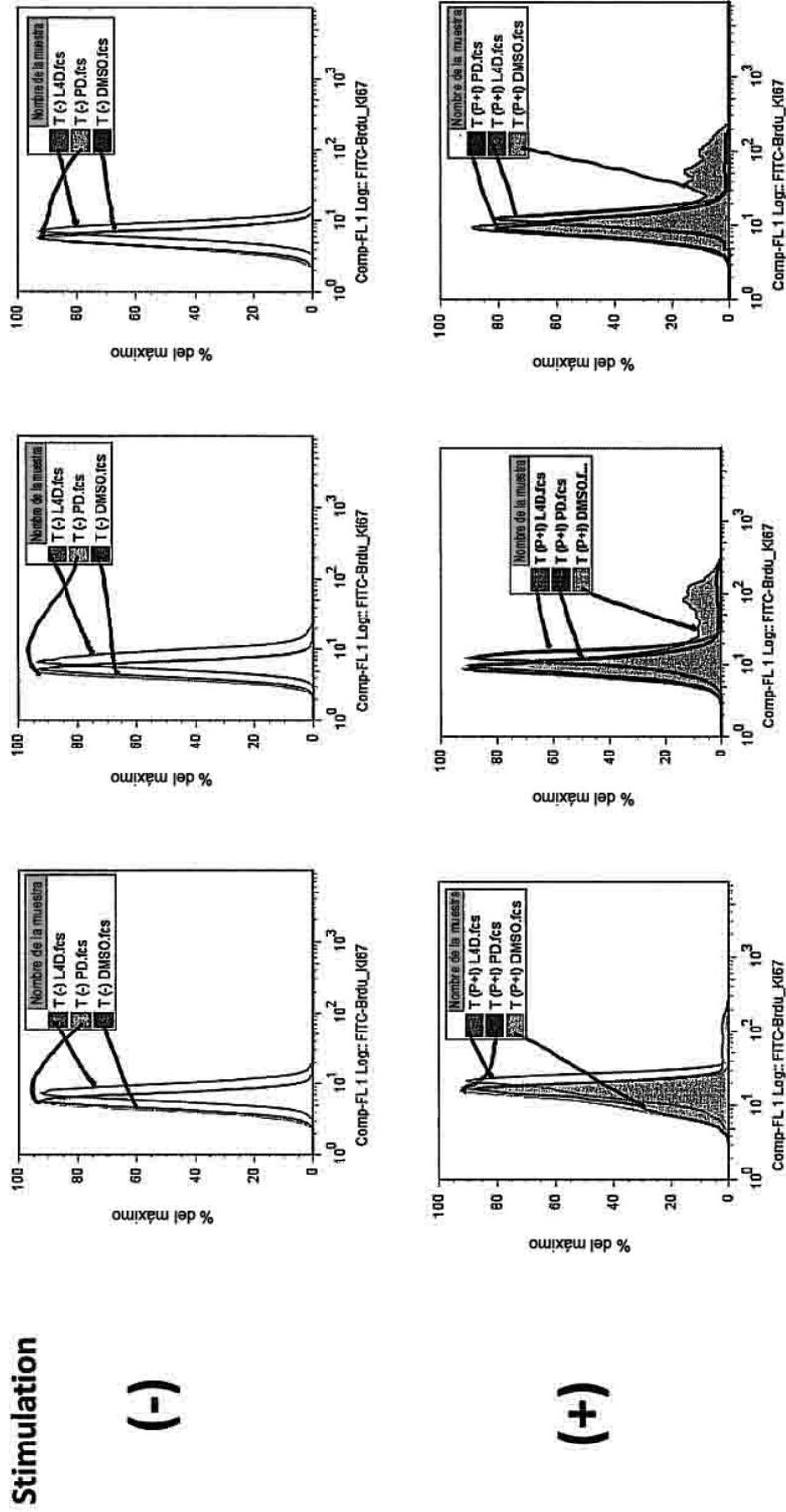


FIG. 14



Resultados similares en el compartimento de CD8+

FIG. 15

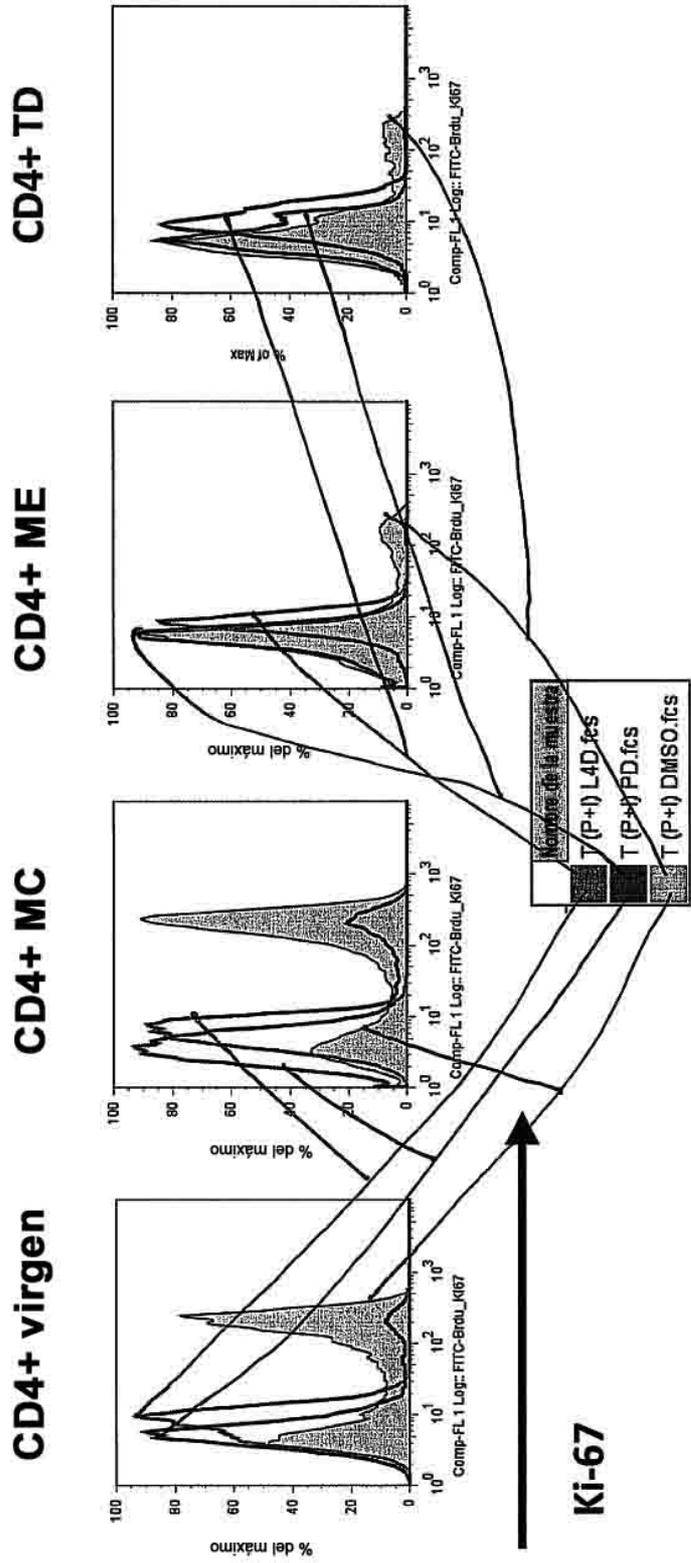


FIG. 16

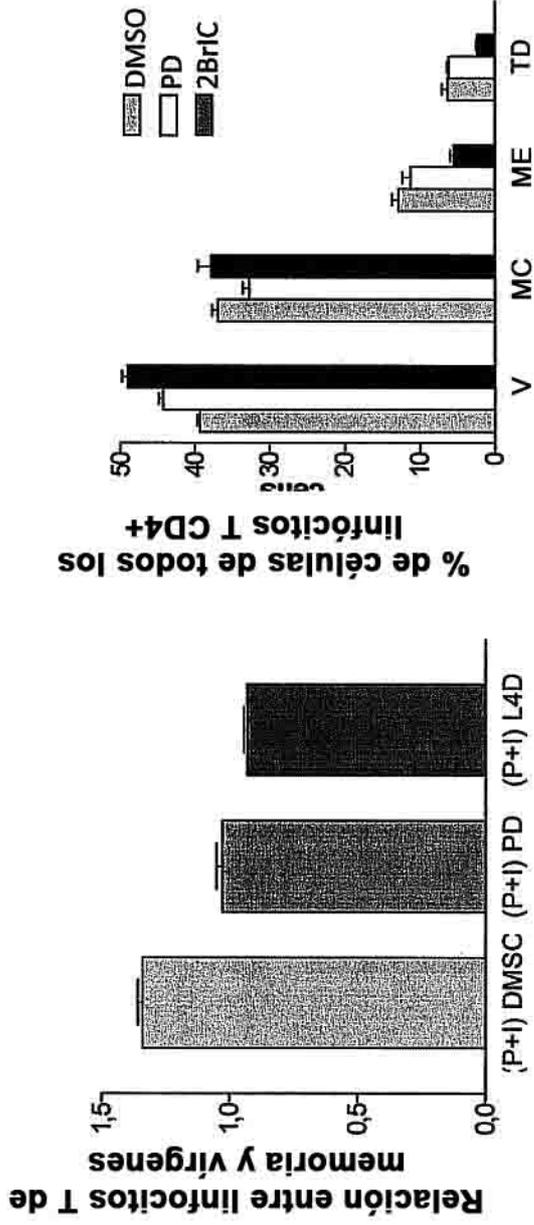
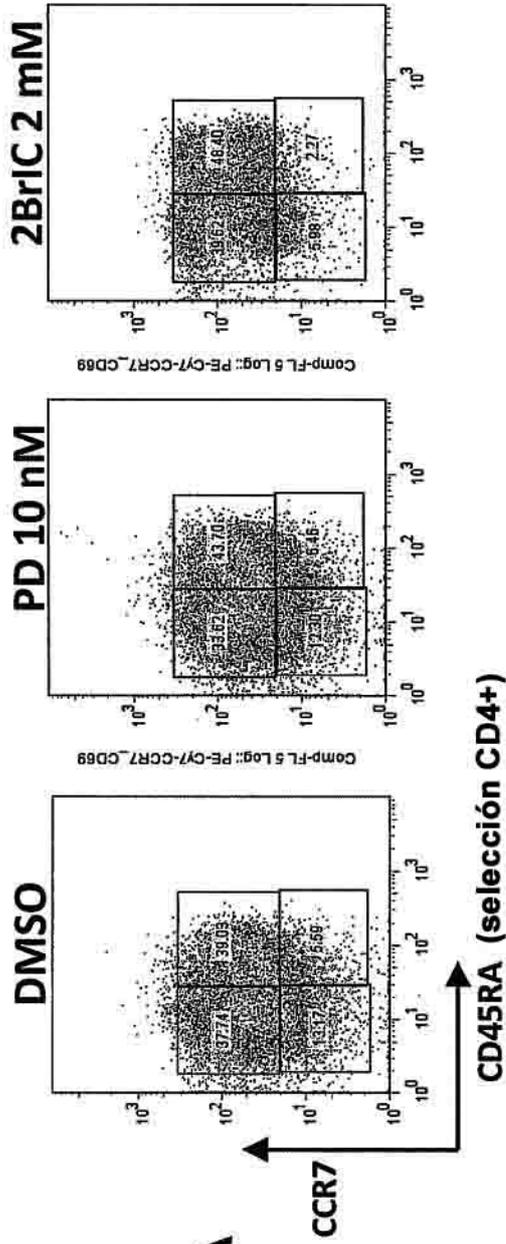


FIG. 17C

FIG. 17B

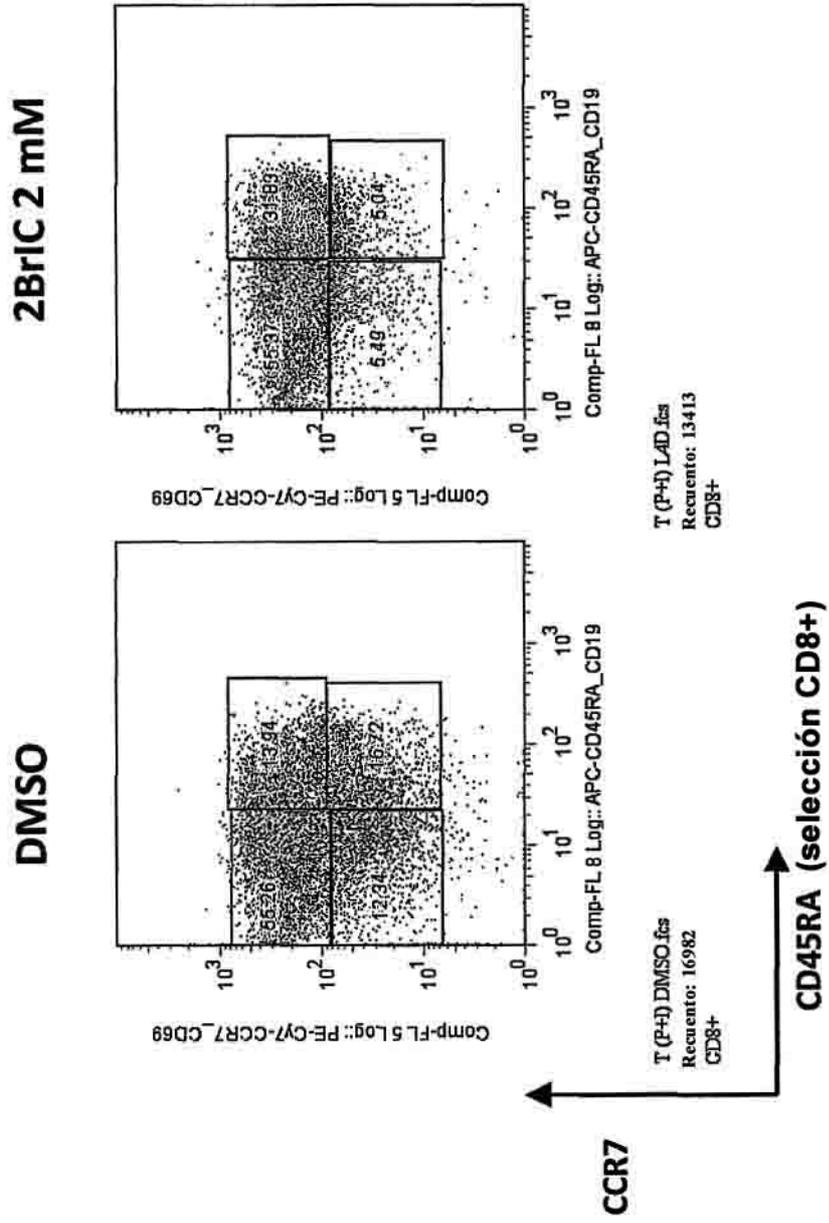


FIG. 18

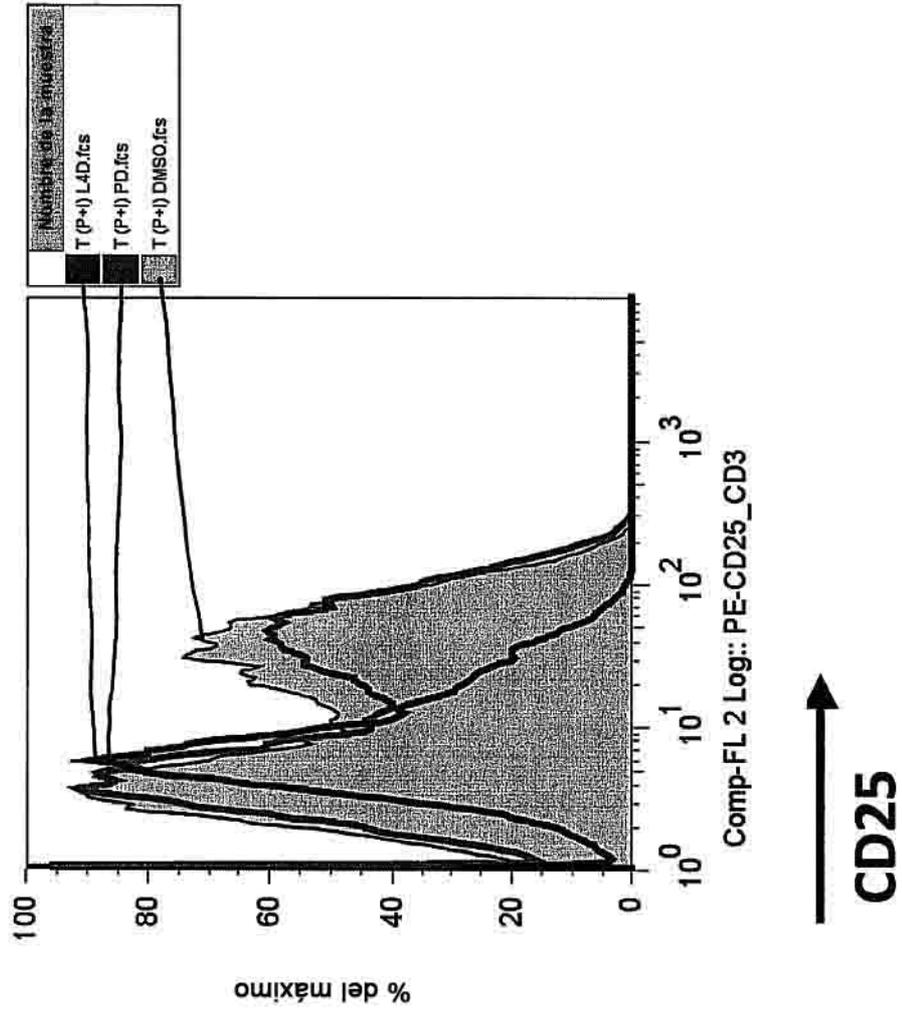


FIG. 19

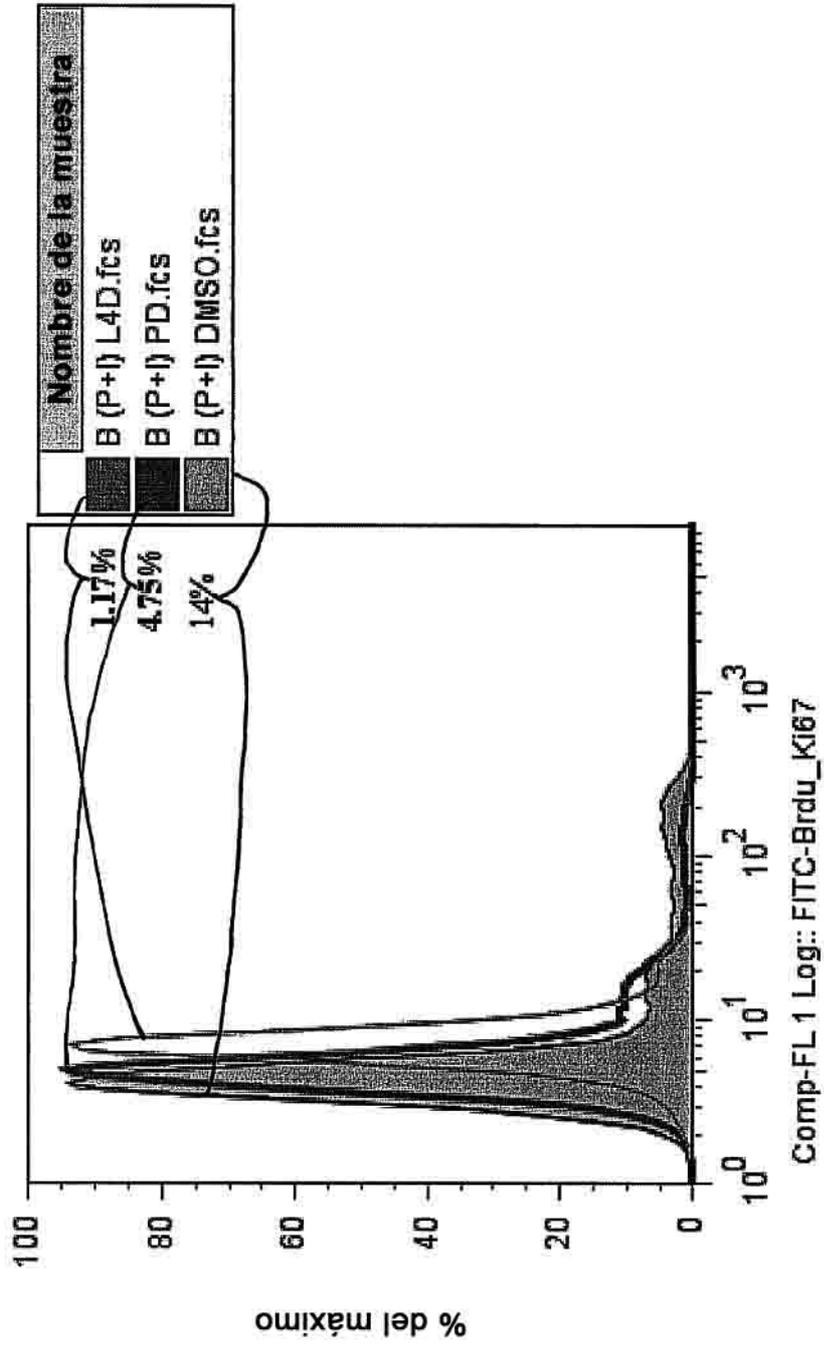
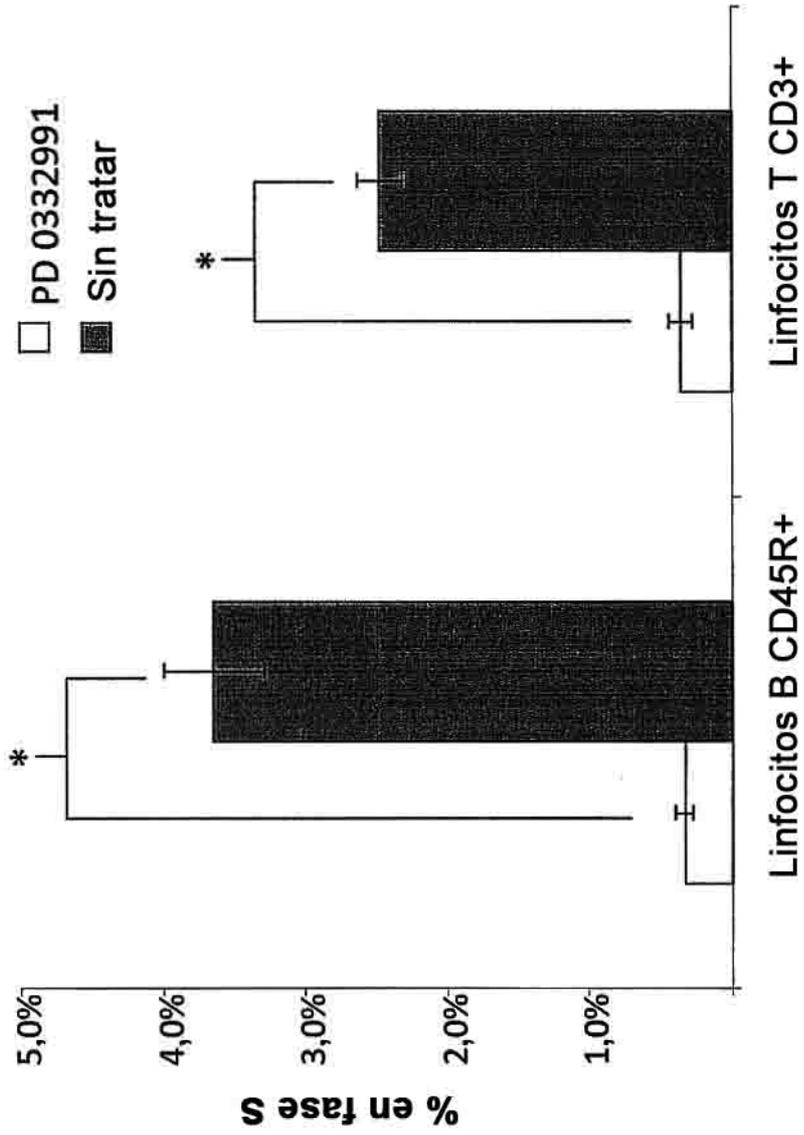
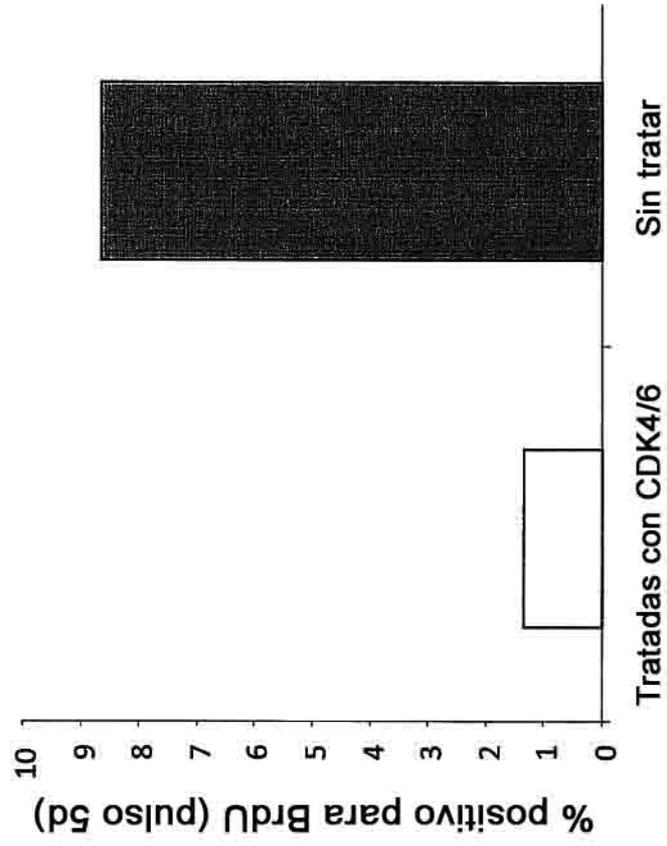


FIG. 20



* = p<0,001

FIG. 21



Linfocitos B220 y linfocitos B del bazo

FIG. 22

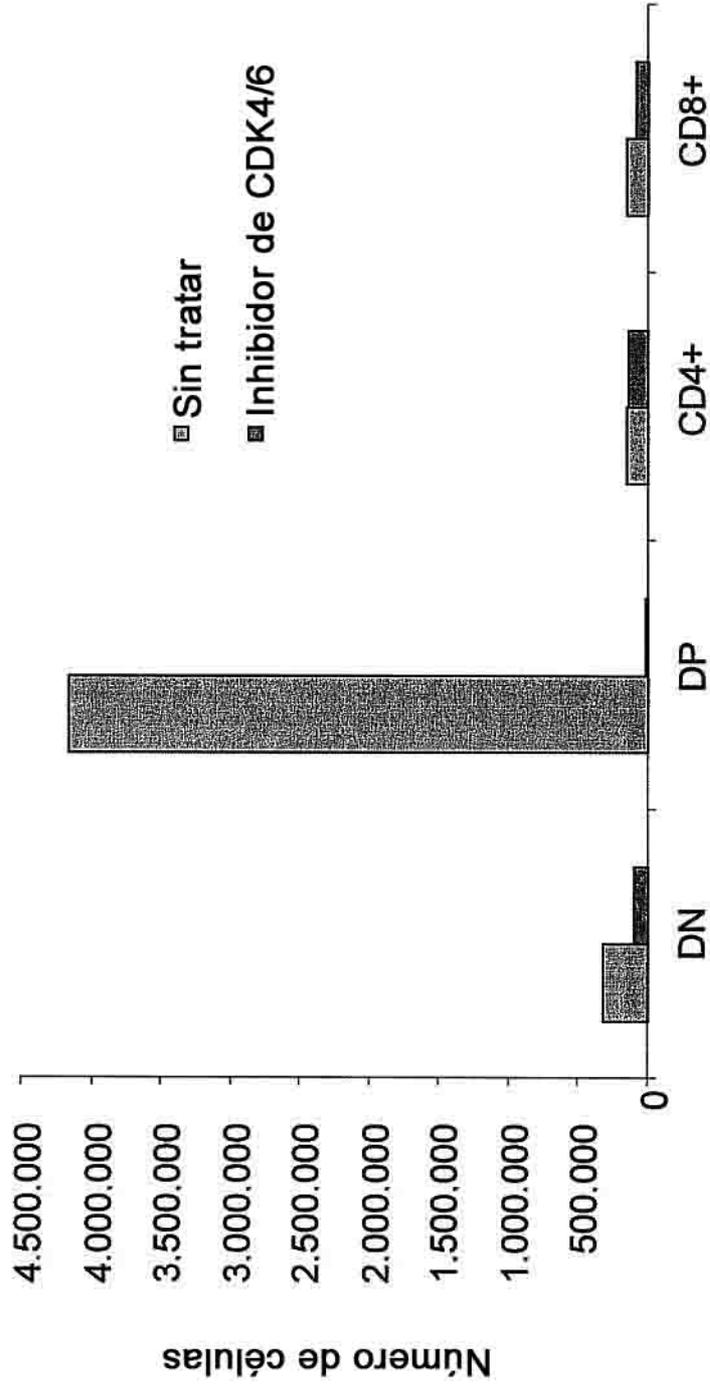


FIG. 23