

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 486**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7056 (2006.01)

C07H 19/23 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014 E 14170596 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2949330**

54 Título: **Actividad antitumoral de inhibidores de múltiples quinasas en el cáncer de mama triple negativo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2017

73 Titular/es:

ENTRECHEM, S.L. (100.0%)
Edificio Científico Tecnológico Campus El
Cristo
33006 Oviedo, ES

72 Inventor/es:

OCAÑA FERNÁNDEZ, ALBERTO;
PANDIELLA ALONSO, ATANASIO y
MORÍS VARAS, FRANCISCO

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 611 486 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

Actividad antitumoral de inhibidores de múltiples quinasas en el cáncer de mama triple negativo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición que comprende a) un nuevo inhibidor de múltiples quinasas; y b) al menos un agente quimioterapéutico. La presente invención se refiere además al uso de dicha composición en la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama triple negativo. Además, la presente invención también desvela una composición farmacéutica que comprende la composición anteriormente mencionada y un método para su producción.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea como se ha demostrado a nivel genómico con la descripción de los diferentes subtipos del cáncer de mama con un resultado clínico independiente [*Cancer Cell* 2007; 11: 259-273, *Cell* 2011; 144: 646-674, *Nature* 2000; 406: 747-752, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2001; 98: 10869-10874]. Entre ellos, el cáncer de mama triple negativo (TNBC) se refiere al cáncer de mama que carece de la expresión del receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor de Her2/neu (HER2), y representa el 15 % de todos los tumores de mama [*Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 5367-5374]. En el TNBC, varias quinasas de membrana e intracelulares se pueden activar de forma concomitante [*Cell* 2011; 144: 703-718, *Oncogene* 2013; 33: 148-156]. La PI3K/mTOR y la vía MAPK están comúnmente fosforiladas en este tipo de tumor [*Oncogene* 2013; 33: 148-156]. Quinasas activadas con menor frecuencia incluyen STAT1, STAT3 o SRC, entre otras [*Oncogene* 2013; 33: 148-156]. Se asocia con un patrón de recaída del tumor específico y un aumento de la sensibilidad a la quimioterapia [*Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 4429-4434, *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 5533-5540]. Mediante el uso de análisis de expresión génica, se ha clasificado en siete subtipos con diferentes sensibilidades al tratamiento [*J. Clin. Invest.* 2011; 121: 2750-2767, *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 5533-5540]. Aunque la identificación de estos diferentes subtipos representa un avance importante en el cáncer, por desgracia, la aplicación de esta clasificación con fines terapéuticos no está clara [*J. Clin. Invest.* 2011; 121: 2750-2767]. Por lo tanto, las opciones terapéuticas disponibles para los pacientes con TNBC se limitan al tratamiento convencional con quimioterapia [*Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 5533-5540, *Cancer Treat. Rev.* 2013; 39: 68-76], y el pronóstico de los pacientes con TNBC es malo debido a las limitadas opciones terapéuticas y a la falta de agentes dirigidos específicos [*Lancet Oncol.* 2007; 8: 235-244].

35 El documento EP 2277885 A1 desvela inhibidores del crecimiento tumoral basados en la familia de indolocarbazoles glicosilados. Los receptores de tirosina quinasas (RTKs) y sus rutas aguas abajo participan en la regulación de muchas funciones celulares incluyendo la proliferación y la supervivencia [*Cell* 2011; 144: 703-718, *Oncogene* 2014; 33: 148-156, *Cell* 1990; 61: 203-212, *Cell* 2000; 103: 211-225] y desempeñan un papel central en la génesis y/o la promoción de diferentes subtipos de tumores de cáncer de mama incluyendo el subtipo triple negativo. Usando muestras humanas, los inventores y otros grupos de investigación evaluaron el perfil de quinasa de los TNBC, observando que una serie de RTKs se activan; tal como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) o el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), entre otros [*Oncogene* 2014; 33: 148-156]. Además, varios componentes de la vía PI3K/mTOR se fosforilaron en una proporción significativa de los pacientes [*Oncogene* 2014; 33: 148-156, *Cancer Res.* 2013; 73: 6346-6358]. Curiosamente, la inhibición de la vía PI3K produjo una detención proliferativa en modelos celulares y una reducción del crecimiento de tumores implantados en los animales xenoinjertados o generados usando modelos transgénicos [*Oncogene* 2014; 33: 148-156]. Cabe señalar que los estudios clínicos que evalúan los fármacos dirigidos a receptores individuales han mostrado resultados decepcionantes que sugieren que se deben desarrollar estrategias terapéuticas para inhibir una serie de nodos oncogénicos clave [*J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 2586-2592]. Además, diferentes estudios, incluyendo aquellos que usan enfoques de secuenciación, han demostrado la relevancia de algunos componentes de estas rutas de señalización, incluyendo la vía PI3K/mTOR [*Cell* 2011; 144: 703-718, *Nature* 2012; 486: 395-399]. Basándose en la importancia global de la activación de las RTKs y las vías aguas abajo en el TNBC, el desarrollo de nuevos inhibidores de múltiples quinasas que podrían presentar polifarmacología contra nodos oncogénicos clave es un objetivo principal, y los inhibidores de tirosina quinasas (TKI) diseñados para neutralizar su función están en desarrollo clínico.

55 Las alteraciones de la maquinaria de reparación del ADN parecen ser de gran importancia en este subtipo de cáncer, y particularmente en los tumores de mama de tipo basal [*J. Natl. Cancer Inst.* 2003; 95: 1482-1485, *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 814-819]. Este subgrupo está enriquecido de genes asociados con la respuesta de proliferación y de daño en el ADN, cuando se evalúan mediante análisis de expresión génica [*J. Clin. Invest.* 2011; 121: 2750-2767]. Está enriquecido con mutaciones somáticas y adquiridas en los genes de reparación del ADN, principalmente BRCA1 y BRCA2, involucrados en el mecanismo de reparación de recombinación homóloga (HR) [*Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 814-819]. La asociación entre las RTKs o sus vías aguas abajo con los mecanismos de reparación del ADN no está clara. Sin embargo, la activación de algunas rutas como la vía PI3K/mTOR se ha relacionado con la reparación del ADN y la sensibilidad al estrés genotóxico [*Science* 2013; 341: 395-9, *EMBO Mol. Med.* 2009; 1: 315-322]. Además, el tratamiento con algunos TKI solos o en combinación indujo daño en el ADN. De hecho, la administración del inhibidor de múltiples tirosina quinasas dasatinib, con el anticuerpo anti-HER2

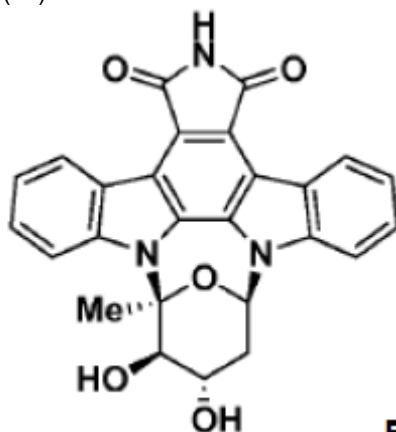
trastuzumab, indujo daño en el ADN, y se sinergizó con la quimioterapia [J. Natl. Cancer Inst. 2010; 102: 1432-1446]. Dado que los tumores de tipo basal muestran un aumento en la proliferación y un deterioro de los mecanismos de reparación del ADN, sería deseable identificar fármacos que dañaran el ADN, además de proporcionar un efecto antiproliferativo.

5 El problema de la presente invención es proporcionar medios mejorados de prevención y/o tratamiento del TNBC que no solo induzcan daño en el ADN de dichos tumores, sino que también proporcionen un efecto antiproliferativo, específico del tumor, de modo que no presenten efectos secundarios adversos.

10 **Breve descripción**

La presente invención se refiere a una composición que comprende:

a) un compuesto de Fórmula (III)



Fórmula (III)

15 y
b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, docetaxel y olaparib.

20 A lo largo de la presente memoria descriptiva, el compuesto de Fórmula (III) se ha usado para ilustrar los efectos reivindicados.

En una realización preferida de la presente invención, el al menos un agente quimioterapéutico es el agente antineoplásico a base de platino carboplatino.

25 Como alternativa, en otra realización preferida de la presente invención, el al menos un agente quimioterapéutico es el agente quimioterapéutico antimitótico docetaxel. Además, en otra realización preferida alternativa de la presente invención, el al menos un agente quimioterapéutico es el inhibidor de la poli adenosina difosfato ribosa polimerasa (PARP) olaparib.

30 La presente invención se refiere a una composición, como se describe en el presente documento, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama en un paciente. La presente invención también se refiere a una composición, como se describe en el presente documento, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama triple negativo en un paciente.

35 Además, la presente invención también se refiere a un uso de una composición, como se describe en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama, preferentemente el cáncer de mama triple negativo.

Además, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

40 a) un compuesto de Fórmula (III), como se describe en el presente documento; y
b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, docetaxel y olaparib.

Además, la presente invención se refiere a un método de producción de una composición farmacéutica que comprende mezclar:

45 a) un compuesto de Fórmula (III), como se describe en el presente documento; y
b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, docetaxel y olaparib.

50 También se describe en el presente documento un método de prevención y/o tratamiento de pacientes que padecen

cáncer de mama, preferentemente cáncer de mama triple negativo, que comprende la administración, a un paciente que la necesita, o a un sujeto con riesgo de padecer cáncer de mama, preferentemente cáncer de mama triple negativo, de una dosis, o cantidad, eficaz de la combinación de compuestos activos o de una composición que comprende los mismos, en particular, representada por la combinación de un compuesto de fórmula I, y más preferentemente de un compuesto seleccionado entre un compuesto de fórmula (II), fórmula (III) o fórmula (IV); con al menos un agente quimioterapéutico, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es un agente antineoplásico a base de platino seleccionado entre cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatinato y lipoplatino, más preferentemente cisplatino o carboplatino; un agente quimioterapéutico antimitótico seleccionado entre taxanos y alcaloides de la vinca, más preferentemente seleccionado entre vinorelbina, docetaxel, paclitaxel, vinblastina y vincristina, además preferentemente vinorelbina o docetaxel; o un inhibidor de PARP seleccionado entre olaparib, rucaparib y veliparib, más preferentemente olaparib.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. A. Efecto antiproliferativo dependiente de la dosis de Fórmula (III) (EC) en células HS578T, BT549 y MDA-MB-231 (MDAMB231) cultivadas en DMEM con FBS al 10 %, y en células HCC3153 cultivadas en RPMI con FBS al 10 %, determinado como el porcentaje de metabolismo del MTT [metabolización, medida en función de la absorbancia a 562 nm (A_{562})] a dosis de 0 a 2 μ M tras 72 h; **B.** Efecto antiproliferativo dependiente del tiempo de Fórmula (III) (500 nM) en células HS578T, BT549 y MDA-MB-231 (MDAMB231) cultivadas en DMEM con FBS al 10 %, y en células HCC3153 cultivadas en RPMI con FBS al 10 %, determinado como el porcentaje de metabolismo del MTT [metabolización, medida en función de la absorbancia a 562 nm (A_{562})] durante 6 días.

Figura 2. A. Efecto de Fórmula (III) (EC) sobre la formación de estructuras esféricas en cultivos de HS578T, BT549 y MDA-MB-231 (MDAMB231) en matrigel, un medio semisólido en el que las células crecen formando estructuras esféricas. **B.** Efecto de Fórmula (III) (EC) en el diámetro en unidades arbitrarias (UA) de las estructuras esféricas formadas en cultivos de HS578T, BT549 y MDA-MB-231 (MDAMB231) en matrigel.

Figura 3. Efecto antiproliferativo en células HS578T, BT549 y MDA-MB-231 (MDAMB231) cultivadas en DMEM con FBS al 10 %, medido como el porcentaje de metabolismo del MTT (metabolización) con respecto a un control sin tratar (CTRL, para el que los valores de absorbancia medios de las muestras no tratadas de cada línea celular se tomaron como el 100 %) de **A.** Administración de una dosis fija durante 72 horas de Fórmula (III) (EC), vinorelbina (VINO), o una combinación de los mismos (ECVINO); **B.** Administración de una dosis fija durante 72 horas de Fórmula (III) (EC), docetaxel (DOC), o una combinación de los mismos (ECDOC); y **C.** Administración de una dosis fija durante 72 horas de Fórmula (III) (EC), carboplatino (CARBO), o una combinación de los mismos (ECCARBO).

Figura 4. Índices de combinación se calcularon usando el software Calcsyn para células HS578T (triángulos), BT549 (círculos) y MDA-MB-231 (MDAMB231, cuadrados) con **A.** dosis combinadas de Fórmula (III) (EC) en el intervalo nanomolar con dosis de vinorelbina [eje x = concentración de Fórmula (III) (EC) (nM)/concentración de vinorelbina (nM)]; **B.** dosis combinadas de Fórmula (III) (EC) en el intervalo nanomolar con dosis de carboplatino [eje x = concentración de Fórmula (III) (EC) (nM)/concentración de carboplatino (nM)]; y **C.** dosis combinadas de Fórmula (III) (EC) en el intervalo nanomolar con dosis de docetaxel [eje x = concentración de Fórmula (III) (EC) (nM)/concentración de docetaxel (nM)].

Figura 5. Análisis de citometría de flujo del efecto de la Fórmula (III) (EC) (500 nM) en células HS578T, BT549 y MDA-MB-231 cultivadas en DMEM con FBS al 10 % sobre **A.** el ciclo celular, medido como el porcentaje medio de células de las diferentes fases (G0/G1, S y G2/M) de la progresión del ciclo celular medida mediante citometría de flujo tras 12 y 24 horas de tratamiento y con tinción con yoduro de propidio (PI); **B.** la apoptosis, medido como el porcentaje medio de células positivas o negativas a la tinción con anexina de tres experimentos independientes tras 24 y 48 horas de tratamiento teñidas con anexina V.

Figura 6. Inhibición de los componentes de la vía PI3K/mTOR/AKT y JAK/STAT por Fórmula (III) (EC) (500 nM) tras el tratamiento inicial (C) y hasta 24 h de tratamiento, determinada usando una Western Blot de AKT fosforilada (pS473-AKT, pT308-AKT), p70 S6 (p-p70 S6) y STAT3 (p-STAT3) normalizada con respecto a GAPDH.

Figura 7. Efecto apoptótico sobre las células BT549 (barras negras) y HS578T (barras blancas) de Fórmula (III) (EC), docetaxel (DOC), carboplatino (CARBO), o combinaciones de del primero con docetaxel (EC/DOC) o carboplatino (EC/CARBO) frente a un control (C) determinado como un porcentaje de células que expresan anexina V tras 48 horas.

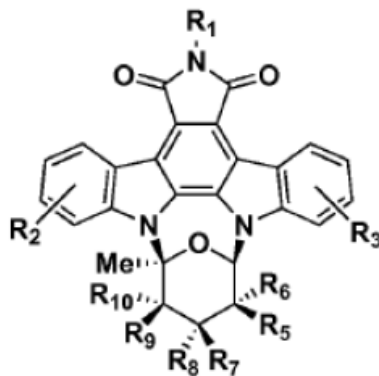
Figura 8. Efecto de daño en el ADN de Fórmula (III) (EC) (500 nM), determinado usando una Western Blot de γ H2AX fosforilada (p-H2AX), p53 (p-P53), Chk2 (p-Chk2), Cdc2 (p-Cdc2) e histona H3 (p-histona H3), así como las ciclinas A, B y D3 como marcadores de dicho daño frente a la tubulina en células HS578T tras el tratamiento inicial (C) y hasta 24 h de tratamiento.

Figura 9. Efecto de daño en el ADN de Fórmula (III) (EC), docetaxel (DOC), carboplatino (CARBO), o combinaciones de del primero con docetaxel (EC/DOC) o carboplatino (EC/CARBO) frente a un control (C), determinado usando un Western Blot de la expresión de p_{H2}AX (p-H2AX) como marcador de dicho daño en células BT549 (superior) y HS578T células (centro), normalizado con respecto a la expresión de GAPDH.

5

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a una composición que comprende a) un compuesto de Fórmula (I)



Fórmula (I)

10

en donde R₁, R₂ y R₃ son, cada uno e independientemente, hidrógeno o un grupo protector, en donde dicho grupo protector puede consistir en un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo heterocíclico, un grupo hidroxialquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alcoxialquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo alquilarilo, un grupo éster, un grupo carbonato, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo uretano, un grupo sililo, un grupo sulfóxido o una combinación de los mismos, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo o un grupo -OR₄, en donde R₄ es un grupo protector de acuerdo con la definición anterior; y

15

b) al menos un agente quimioterapéutico.

20

Preferentemente, la composición de la presente divulgación comprende un compuesto de Fórmula (I) en donde R₁, R₂ y R₃ son hidrógeno, R₉ es OH, R₁₀ es hidrógeno, y R₅, R₆, R₇ y R₈ son, cada uno e independientemente, hidrógeno, hidroxilo o un grupo -OR₄, en donde R₄ es un grupo protector seleccionado entre un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalquilo heterocíclico, un grupo hidroxialquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alcoxialquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo éster, un grupo ácido carboxílico, un grupo aldehído, un grupo cetona, un grupo sililo, un grupo sulfóxido o una combinación de los mismos.

25

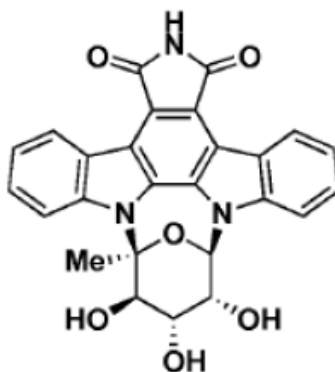
En la presente divulgación, el grupo protector R₄ se selecciona preferentemente entre un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo arilo heterocíclico, un grupo aldehído, un grupo sulfóxido o una combinación de los mismos, más preferentemente un grupo alquilo, un grupo cicloalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, o una combinación de los mismos, además preferentemente un grupo alquilo.

30

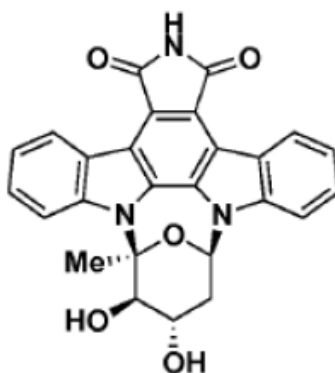
Aún más preferentemente, la composición de la presente divulgación comprende un compuesto de Fórmula (I) en donde R₁, R₂ y R₃ son hidrógeno, R₉ es OH, R₁₀ es hidrógeno, y R₅, R₆, R₇ y R₈ son, cada uno e independientemente, hidrógeno o hidroxilo. Además, preferentemente, la composición de la presente divulgación comprende un compuesto de Fórmula (I) en donde R₁, R₂ y R₃ son hidrógeno, R₉ es OH y R₁₀ es hidrógeno, en donde uno de R₇ o R₈ es hidrógeno, y el otro es hidroxilo, y R₅ y R₆ son, cada uno e independientemente, hidrógeno o hidroxilo.

35

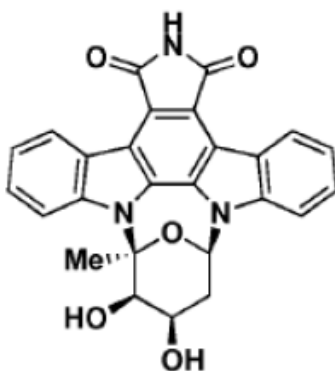
En una divulgación preferida, la composición comprende un compuesto de Fórmula (I) seleccionado entre Fórmula (II), Fórmula (III) y Fórmula (IV):



Fórmula (II)



Fórmula (III)



Fórmula (IV).

La Fórmula (III) es una de las moléculas de indolocarbazol híbrido englobadas por la estructura definida en el presente documento por la Fórmula (I). La Fórmula (III) se obtiene a partir de bacterias modificadas genéticamente por biosíntesis combinatoria de las vías de biosíntesis de la rebecamicina y estaurosporina, y producidas por fermentación [*Chem. Commun. (Camb.)* 2009: 4118-20]. La Fórmula (III) muestra afinidad hacia e inhibe la actividad de una gama de tirosina y serina/treonina quinatas en ensayos bioquímicos en el intervalo nanomolar y subnanomolar, muestra actividad antitumoral en una amplia gama de tumores sólidos, tanto en los ensayos de proliferación como de esferas, e inhibe los nodos de señalización claves en el intervalo submicromolar, a concentraciones muy por debajo de los niveles plasmáticos en animales de experimentación. Por lo tanto, la

Fórmula (III) es un inhibidor de múltiples quinasas, más específicamente un inhibidor de serina/treonina quinasas. Estudios en modelos animales mostraron la actividad antitumoral de la Fórmula (III) *in vivo* sin evidencia de toxicidad. De hecho, la Fórmula (III) ha completado su evaluación de seguridad en animales y está a punto de iniciar su desarrollo clínico. Sin embargo, la especificidad limitada de la Fórmula (III) condujo a la inhibición de vías relevantes como la ruta JAK/STAT, que participa en la génesis de los tumores de mama con propiedades de células madre [J. Clin. Invest. 2011; 121:2723-2735].

Otra divulgación preferida comprende una composición, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es un agente quimioterapéutico adecuado para su uso en el tratamiento del cáncer de mama. En una realización preferida adicional, el al menos un agente quimioterapéutico se selecciona entre agentes antineoplásicos a base de platino, agentes quimioterapéuticos antimetabólicos o inhibidores de PARP. Los inhibidores de PARP son un grupo de inhibidores farmacológicos de la enzima poli adenosina difosfato ribosa polimerasa, también conocida como la poli ADP ribosa polimerasa (PARP).

En otras divulgaciones preferidas, la composición comprende al menos un agente quimioterapéutico, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico es:

- a) un agente antineoplásico a base de platino seleccionado entre cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, tetranitrato de triplatino y lipoplatino;
- b) un agente quimioterapéutico antimetabólico seleccionado entre taxanos y alcaloides de la vinca; y/o
- c) un inhibidor de PARP seleccionado entre olaparib, rucaparib y veliparib.

Otra divulgación preferida comprende una composición de acuerdo con cualquiera de lo anterior, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es cisplatino o carboplatino. Otra divulgación preferida comprende una composición, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, en donde el al menos un agente quimioterapéutico se selecciona entre vinorelbina, docetaxel, paclitaxel, vinblastina, vindesina y vincristina, además preferentemente entre vinorelbina o docetaxel. En una realización preferida, la presente invención comprende una composición, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es olaparib.

Preferentemente, el al menos un agente quimioterapéutico, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, se selecciona entre cisplatino, carboplatino, vinorelbina, docetaxel y olaparib. Como alternativa, el al menos un agente quimioterapéutico, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, se selecciona entre cisplatino, carboplatino y docetaxel. El al menos un agente quimioterapéutico, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, también se puede seleccionar entre carboplatino y docetaxel.

Por lo tanto, una divulgación preferida se refiere a una composición que comprende:

- a) un compuesto de Fórmula (I), en donde R_1 , R_2 y R_3 son hidrógeno, R_9 es OH, R_{10} es hidrógeno, y R_5 , R_6 , R_7 y R_8 son, cada uno e independientemente, hidrógeno o hidroxilo; y
- b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre cisplatino, carboplatino, nedaplatino, lipoplatino, vinorelbina, docetaxel, paclitaxel, vinblastina, vindesina, vincristina y olaparib.

Otra divulgación preferida se refiere a una composición que comprende:

- a) un compuesto de Fórmula (I), en donde R_1 , R_2 y R_3 son hidrógeno, R_9 es OH y R_{10} es hidrógeno, en donde uno de R_7 y R_8 es hidrógeno, y el otro es hidroxilo, y R_5 y R_6 son, cada uno e independientemente, hidrógeno o hidroxilo; y
- b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre cisplatino, carboplatino, lipoplatino, vinorelbina, docetaxel, paclitaxel, vinblastina, vindesina y olaparib.

La presente divulgación también se refiere a una composición, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama en un paciente. En otras palabras, la presente divulgación también se refiere al uso de una composición, de acuerdo con cualquiera de lo anterior, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama. Preferentemente, dicho cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (TNBC). El TNBC se refiere a un cáncer de mama que no expresa los genes para el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona y Her2/neu.

La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- a) un compuesto de Fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de lo anterior; y
- b) al menos un agente quimioterapéutico.

Otra realización preferida de la presente divulgación comprende un método de producción de cualquiera de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, que comprende mezclar:

- a) un compuesto de Fórmula (I) de acuerdo con lo anterior; y

b) al menos un agente quimioterapéutico.

Dicho método puede implicar, además, una etapa de calentamiento, agitación, centrifugación y/o filtración para garantizar la homogeneidad de la mezcla resultante.

A continuación, se presentan ejemplos de las composiciones de la presente invención y otras composiciones divulgadas en el presente documento, y los procesos representativos para su aislamiento, uso y fabricación, pero no se deben interpretar como limitantes de la invención.

Ejemplos

I) Material y métodos

a) Cultivo de células y compuestos farmacológicos

Se cultivaron HS578T, BT549 y MDA-MB-231 en DMEM y HCC3153 en RPMI; ambos medios se adquirieron en Sigma Aldrich, suplementados con FBS al 10 %, 100 mU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM, en una atmósfera de CO₂ al 5 % a 37 °C. Estas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo se obtuvieron de la colección de biología celular de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) (Manassas, VA). El medio se cambió cada 2 días.

Para el cultivo de células tridimensional, se cubrió la parte inferior de las placas de 24 pocillos con una capa fina de Matrigel al 4 % enfiada con hielo (BD Biosciences), y se incubó a 37 °C durante 20 minutos para permitir que el Matrigel se solidificara. Se añadió Matrigel a DMEM convencional. Se tripsinizaron las células deseadas (solución de tripsina-EDTA al 0,25 % (2,5 g/l de tripsina, 0,38 g/l de EDTA), se recogieron y se volvieron a suspender a una concentración final de 12.500 cels/ml en Matrigel al 2 %. Se añadió la suspensión celular sobre la capa de Matrigel solidificada, y se incubó a 37 °C. Se cambió el medio tras 4 días, y el cultivo celular se visualizó con un microscopio todos los días para controlar el fenotipo. Las células se cultivaron durante 10 días.

El inhibidor de múltiples tirosina quinasas de Fórmula (III) fue proporcionado por Entrechem S. L. El cisplatino, el carboplatino, el docetaxel y la vinorelbina se adquirieron en Selleckchem. El olaparib se adquirió/fue proporcionado por?

b) Metabolización del MTT

Se llevaron a cabo experimentos de proliferación y crecimiento celular usando ensayos de captación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en los que el MTT es reducido a formazán púrpura por las mitocondrias de las células vivas. El aumento del número de células se detecta por el aumento de la metabolización del MTT, y la reducción del número de células se refleja por una reducción. Se sembraron células HS578T, BT549, MDA-MB-231 y HCC3153 a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos, y se cultivaron durante la noche en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Se trataron las células con el fármaco a diferentes concentraciones para trazar las curvas de dosis-respuesta en todas las líneas celulares de cáncer usadas en el estudio. La curva de tiempo-respuesta se realizó usando la dosis CI₅₀ de 500 nM. Tras el tratamiento, se reemplazó cada pocillo por 250 µl de medio recién preparado que contenía MTT (0,5 µg/ml) y se incubó durante 1 hora. Se retiró el medio y se añadieron 500 µl de dimetilsulfóxido a cada pocillo. Se agitó la placa a oscuras durante 5 minutos para disolver los cristales de MTT-formazán. Se registró la absorbancia de las muestras a 562 nm en un lector de placas de múltiples pocillos (BMG Labtech). Los resultados se representaron como los valores medios de valores cuadruplicados de un experimento representativo que se repitió al menos dos veces independientes.

Para determinar si la Fórmula (III) en combinación con otros fármacos de quimioterapia era sinérgica, aditiva o antagonista, se usó el programa de software v2.0 Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO). Este programa permite el cálculo del índice de combinación (IC) basado en el algoritmo de Chou y Talalay [*Cancer Res.* 2010; 70: 440-446]. Un valor de índice de combinación inferior a 1 indica sinergia, los valores iguales a 1 indican un efecto aditivo, mientras que los valores superiores a 1 indican antagonismo. Se generaron los valores de índice de combinación de tres experimentos independientes.

c) Ensayos del ciclo celular y de la apoptosis

El análisis del ciclo celular y la evaluación de la apoptosis se realizaron mediante citometría de flujo usando yoduro de propidio y Anexina V, respectivamente.

Para los análisis del ciclo celular, se cultivaron las células HS578T, BT549 y MDA-MB-231 en placas de cultivo de 100 mm, se desarrollaron hasta el 70 % de confluencia y se trataron con Fórmula (III) 500 nM durante 24 h. A continuación, se incubaron las monocapas celulares en tripsina-EDTA y se volvieron a suspender en 1 ml de PBS. Tras tres lavados con PBS, se volvieron a suspender los sedimentos celulares en etanol al 70 % enfiado con hielo durante 2 min y se centrifugaron durante 5 min a 1.800 rpm. Se trataron los sedimentos celulares con 1 ml de

solución de tinción de yoduro de propidio (PI) (PBS que contenía 50 µg/ml de PI, Tween 20 al 0,5 %, 0,1 µg/ml de RNasa A) (BD Biosciences), y se incubaron a oscuras durante 1 h. Se realizaron análisis del contenido de ADN y del ciclo celular usando un citómetro de flujo canto II de FACS y el software CellQuest (BD Biosciences).

5 Para los análisis de apoptosis, se incubaron monocapas de células HS578T, BT549 y MDA-MB-231 en tripsina-EDTA, se lavaron dos veces con PBS frío, y después se volvieron a suspender en tampón de unión (ácido exento de HEPES 10 mM [pH 7,4], NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM) a una concentración de 1 x 10⁶ células por ml. Se incubó un total de 1 x 10⁵ células durante 15 minutos a oscuras con Anexina V-APC (BD Biosciences) y solución de tinción de yoduro de propidio (PI) (5 µl de Anexina V-isotiocianato de fluoresceína, 10 µl de PI [5 µl/ml de concentración final], 400 µl de tampón de unión).

d) Western Blotting y serie de anticuerpos

15 Se usaron kits de Western Blot y de series fosforiladas para la evaluación de los productos intermedios de señalización.

Se cultivaron líneas de células HS578T y BT549 en DMEM con FBS al 10 % y, al 70 % de confluencia, se trataron con la Fórmula (III) a 500 nM durante 6, 12 y 24 horas. Se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM) y se lisaron en tampón de lisis enfriado con hielo (Tris-HCl 20 mM [pH 7,0], NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol al 10 %, Nonidet P-40 al 1 %, pepstatina 1 µM, 1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM). Se centrifugaron los lisados a 10.000 g a 4 °C durante 10 minutos. Se cuantificó el nivel de proteína de los sobrenadantes usando el ensayo de proteína BCA (Sigma Aldrich). Se usó un total de 50 µg de proteína de cada muestra para el análisis. Se llevaron luego las muestras a ebullición en tampón de muestra de electroforesis y se colocaron en electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida al 6 %-15 % (SDS-PAGE), en función del peso molecular de las proteínas que se iban a analizar. En resumen, tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas de los geles a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore Corporation). Se bloquearon las membranas en solución salina tamponada con Tris con Tween (TBST) (Tris 100 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %) que contenía albúmina de suero bovino al 1 % durante 1 h y después se incubaron durante la noche con el anticuerpo correspondiente. Anti-pS473-AKT y anti-pT308-AKT se adquirieron en Santa Cruz; Anti-pS6, anti-pSTAT3 y anti-GADPH se adquirieron en Cell Signalling Technology; Anti-pH3 se adquirió en Millipore-Cell Signaling; anti-p-H2AX se adquirió en BD Biosciences. Tras lavar con TBST, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo conjugados con HRP (dilución 1:5000) durante 1 hora, y las bandas se visualizaron mediante el uso del sistema de detección Western Blotting ECL Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

40 Para realizar el análisis de transferencia de puntos con las series comerciales, se usaron dos kits de series de RTKs fosforiladas humanas siguiendo las instrucciones del fabricante respectivo. La serie de quinasas fosforiladas humanas (Catálogo ARY003B) detecta la fosforilación específica de sitio relativa de 43 quinasas intracelulares. El Kit de la serie de tirosina quinasas receptoras fosforiladas (RTK) (Catálogo ARY001 B) detecta la fosforilación de 49 RTKs diferentes.

e) Análisis de micromatrices de ARNm

45 Se cultivaron células MDA-MB-231 en DMEM con FBS al 10 %, y al 70 % de confluencia, se trataron las células con Fórmula (III) 500 nM durante 24 h. Se extrajo el ARN total y se purificó usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen). Se sintetizaron ADNc bicatenarios y ARNc biotinilados usando un cebador T7-polyT y el kit de marcaje de ARN BioArray (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY), respectivamente. Se fragmentó el ARN marcado y se hibridó a series de oligonucleótidos humanos (Human Gene ST Arrays) (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis de datos de las micromatrices, se importaron los archivos de Affymetrix CEL de cada uno de los dos experimentos de hibridación de micromatrices para las dos condiciones [de control sin tratar y con tratamiento con Fórmula (III) 500 nM] al software dChip (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). Se llevó a cabo la normalización de todas las series frente a la serie con la mediana de la intensidad global. Se obtuvieron los genes con diferentes valores de expresión de control frente al grupo tratado. Se analizó la lista de genes usando el análisis bioinformático de micromatrices de anotación funcional (DAVID), y el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA). A continuación, se visualizaron algunas funciones usando el software Cytoscape. Por lo tanto, se realizaron análisis de enriquecimiento del conjunto de genes para identificar las funciones relevantes efectuadas por el fármaco, y los genes identificados se confirmaron mediante RT-PCR.

60 f) Transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (RT)-PCR

Se extrajo el ARN total de las células con el kit RNeasy Mini (QIAGEN) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se sintetizaron los ADNc a partir de 3 mg de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc RevertAid H Minus First Strand (Fermentas) en un volumen total de 12 ml. Se realizó la transcripción inversa a 42 °C durante 60 min, seguida de 10 min a 70 °C para la inactivación. Se llevó a cabo el análisis de PCR en tiempo real con 4,2 ml de

ADNc usando la mezcla maestra de SYBR Fast Green (Applied Biosystems) en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron por triplicado y la expresión del ARNm se normalizó con respecto al ARNr de GADPH, y se cuantificó mediante el método de ciclo umbral comparativo (Ct). Las PCR se realizaron usando los siguientes cebadores específicos (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 20):

5
10
15
20
25

GADPH directo CAATGACCCCTTCATTGACC (SEQ ID NO: 1)
 GADPH inverso GATCTCGCTCCTGGAAGATG (SEQ ID NO: 2)
 XPA directo GCAGCCCCAAAGATAATTGA (SEQ ID NO: 3)
 XPA inverso TGGCAAATCAAAGTGGTTCA (SEQ ID NO: 4)
 GADD45 directo GGAGGAAGTGCTCAGCAAAG (SEQ ID NO: 5)
 GADD45 inverso TGGATCAGGGTGAAGTGGAT (SEQ ID NO: 6)
 BRCA1 directo ACTCTGGGGCTCTGTCTTCA (SEQ ID NO: 7)
 BRCA1 inverso GGTGGTACATGCACAGTTGC (SEQ ID NO: 8)
 BRCA2 directo CCAATGCCTCGTAACAACCT (SEQ ID NO: 9)
 BRCA2 inverso AGCTCTTCACCCTGCAAAAA (SEQ ID NO: 10)
 DDB2 directo GTGACCACCATTGCGCTACT (SEQ ID NO: 11)
 DDB2 inverso TCAAGGACAAACCCACCTTC (SEQ ID NO: 12)
 FANCE directo GGA CT CAGTTCCAACCCAAA (SEQ ID NO: 13)
 FANCE inverso GCTAGTCCACTGGCTTCTGG (SEQ ID NO: 14)
 LIG4 directo GTCTGGGCCTGGATTTTGTGA (SEQ ID NO: 15)
 LIG4 inverso TGCCCCAAAGATGAAGAAAAG (SEQ ID NO: 16)
 PRMT6 directo CTCTTCATAGCCCCCATCAG (SEQ ID NO: 17)
 PRMT6 inverso AATCCCTGCACAACGATCTC (SEQ ID NO: 18)
 RAD52 directo AGTTTTGGGAATGCATTGG (SEQ ID NO: 19)
 RAD52 inverso TCGGCAGCTGTTGTATCTTG (SEQ ID NO: 20).

Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 10 min; luego 40 ciclos a 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 1 min.

30
g) Estudios de xenoinjerto

35
40

Se evaluaron los efectos antitumorales *in vivo* usando animales xenotransplantados. Los ratones se trataron en las instalaciones de animales siguiendo las directrices legales. Se adquirieron ratones desnudos BALB/c hembra, de 7 semanas de vida en Janvier Labs. Tras 15 días en cuarentena, se inyectaron 2-5 x 10⁷ células MDA-MB-231 en 100 µl de PBS con Matrigel al 20 % en las almohadillas de grasa mamaria de los ratones. Dos semanas después de la inyección, se asignaron los ratones al azar en dos grupos (con volúmenes de tumor medios iguales antes del inicio de los tratamientos): control (n = 5) y Fórmula (III) (n = 5). Tras aproximadamente 2 semanas, cuando los tumores alcanzaron un volumen de 150 mm³, se inició el tratamiento. Se anestesiaron los animales por inhalación y luego se trataron con la Fórmula (III). Se midieron los diámetros de los tumores y la inhibición del crecimiento de los tumores cada tres días. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la siguiente fórmula: $V = (L \times W^2)/2$, en la que V = volumen (milímetros cúbicos), L = longitud (milímetros) y W = anchura (milímetros). Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ el día 24 después del inicio de los tratamientos.

45 II) Resultados

a) Efecto antitumoral de la Fórmula (III)

50

Para explorar el efecto de la Fórmula (III) sobre la proliferación, se usó un grupo de líneas celulares de TNBC que incluían HS578T, BT549 y MDA-MB-231. El tratamiento con la Fórmula (III) inhibió la metabolización del MTT de una manera dependiente del tiempo y de la dosis (Figuras 1A, 1B). Las dosis en el intervalo submicromolar (nanomolar) fueron capaces de producir más del 80 % de la inhibición del crecimiento (es decir, proliferación reducida) en todas las líneas celulares estudiadas.

55

A continuación, se examinó el efecto de la Fórmula (III) sobre el crecimiento tridimensional. Con este fin, se cultivaron HS578T, BT549 y MDA-MB-231 en matrigel, un medio semisólido en el que las células crecen formando estructuras esféricas (Figura 2A). El tratamiento con la Fórmula (III) redujo fuertemente el diámetro de estas esferas, lo que demuestra el efecto de la Fórmula (III) sobre la inhibición del crecimiento celular (Figura 2B).

60 b) Efecto de la Fórmula (III) en combinación con agentes quimioterapéuticos

65

Dado que el éxito en la terapia del cáncer se basa en combinaciones de fármacos, se examinó el efecto de la Fórmula (III) en asociación con los agentes quimioterapéuticos usados en el ámbito clínico para los tumores triple negativo, incluyendo vinorelbina, docetaxel y compuestos de platino (cisplatino y carboplatino). En primer lugar, se obtuvo una curva de respuesta a la dosis para estas quimioterapias para seleccionar las dosis en torno a la CI₅₀. A continuación, se combinó la Fórmula (III) con estos agentes (véanse las Tablas 1-15). En general, la administración

de la Fórmula (III) con vinorelbina, carboplatino y docetaxel, usando una dosis fija, aumentó el efecto antiproliferativo de cada agente administrado solo (Figura 3A-C).

5 Para identificar las interacciones sinérgicas, se combinaron varias dosis de Fórmula (III) en el intervalo nanomolar con dosis de estos agentes en torno o por debajo de la CI_{50} en HS578T, BT549 y MDA-MB-231. Con este fin, se usó el algoritmo de Chou-Talay para el análisis del índice de combinación [*Cancer Res.* 2010; 70: 440-446]. Las combinaciones con vinorelbina no fueron sinérgicas en MDA-MB-231 ni en BT549 (véanse las Tablas 3 y 8), y solo para algunas dosis, en HS578T (véase la Tabla 13 y la Figura 4A). Por el contrario, todas las dosis de carboplatino fueron fuertemente sinérgicas en las tres líneas celulares (véanse las Tablas 1, 6 y 11, y la Figura 4B). De manera similar, las combinaciones con docetaxel fueron sinérgicas a la mayoría de las dosis estudiadas (véanse las Tablas 4, 9 y 14, y la Figura 4C). Estos resultados demuestran que la sinergia de las composiciones de la presente invención con los agentes quimioterapéuticos para el cáncer fue inesperada ya sea cualitativamente con respecto al tipo de compuestos quimioterapéuticos o, cuando hubo sinergia, también cuantitativamente, para cada uno de cualquiera de los agentes quimioterapéuticos comprendidos en las composiciones de la invención considerados para la combinación sinérgica.

Tabla 1. Efecto de la Fórmula (III), Carboplatino y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células MDA-MB-231

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Carboplatino
Fórmula (III) (nM)	Carboplatino (nM)	Fórmula (III) (nM) + Carboplatino (nM)	Fórmula (III)		Carboplatino		Fórmula (III) + Carboplatino			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	5,64	100,00	5,64	100,00	5,64		
120	80	120 + 80	63,77	7,75	74,70	4,85	38,35	1,89	0,67	1,5
180	120	180 + 120	49,75	2,69	62,30	2,48	26,27	3,33	0,67	1,5
240	160	240 + 160	38,25	0,33	61,11	4,31	16,38	1,88	0,58	1,5
300	200	300 + 200	28,13	0,65	58,21	3,48	15,56	3,19	0,69	1,5

20

Tabla 2. Efecto de la Fórmula (III), Cisplatino y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células MDA-MB-231

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Cisplatino
Fórmula (III) (nM)	Cisplatino (nM)	Fórmula (III) (nM) + Cisplatino (nM)	Fórmula (III)		Cisplatino		Fórmula (III) + Cisplatino			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	5,64	100,00	5,64	100,00	5,64		
120	80	120 + 80	63,77	7,75	91,74	6,21	56,53	4,11	1,16	1,5
180	120	180 + 120	49,75	2,69	71,66	3,42	49,62	1,98	1,47	1,5
240	160	240 + 160	38,25	0,33	69,26	0,50	33,70	1,40	1,31	1,5
300	200	300 + 200	28,13	0,65	68,95	0,17	15,42	4,33	0,89	1,5

Tabla 3. Efecto de la Fórmula (III), Vinorelbina y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células MDA-MB-231,

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Vinorelbina
Fórmula (III) (nM)	Vinorelbina (nM)	Fórmula (III) (nM) + Vinorelbina (nM)	Fórmula (III)		Vinorelbina		Fórmula (III) + Vinorelbina			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	3,06	100,00	3,06	100,00	3,06		
200	1	200 + 1	60,32	4,06	81,71	8,10	43,22	2,82	1,09	200
260	1,3	260 + 1,3	54,53	3,24	58,44	1,38	46,98	3,43	1,55	200
300	1,6	300 + 1,6	49,39	6,14	58,67	9,77	28,34	3,39	1,17	187,5
380	1,9	380 + 1,9	36,89	4,28	48,51	1,67	27,08	4,48	1,38	200

5 **Tabla 4.** Efecto de la Fórmula (III), Docetaxel y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células MDA-MB-231

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Docetaxel
Fórmula (III) (nM)	Docetaxel (nM)	Fórmula (III) (nM) + Docetaxel (nM)	Fórmula (III)		Docetaxel		Fórmula (III) + Docetaxel			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	2,87	100,00	2,87	100,00	2,87		
100	0,4	100 + 0,4	56,37	4,95	59,33	4,97	43,74	0,67	1,00	250
200	0,8	200 + 0,8	56,35	2,41	33,75	0,13	26,54	2,39	0,86	250
300	1,2	300 + 1,2	40,19	2,15	25,29	0,78	17,90	0,37	0,75	250
400	1,6	400 + 1,6	35,26	3,28	25,28	0,34	13,47	0,41	0,71	250

Tabla 5. Efecto de la Fórmula (III), Olaparib y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células MDA-MB-231

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Olaparib
Fórmula (III) (nM)	Olaparib (nM)	Fórmula (III) (nM) + Olaparib (nM)	Fórmula (III)		Olaparib		Fórmula (III) + Olaparib			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	8,56	100,00	8,56	100,00	8,56		
100	10	100 + 10	62,54	4,67	66,94	6,46	45,75	1,19	0,52	10
200	20	200 + 20	46,90	2,96	58,28	0,27	25,58	0,37	0,32	10
300	30	300 + 30	40,53	0,48	57,33	1,66	18,58	1,15	0,29	10
400	40	400 + 40	33,70	0,01	57,03	1,62	18,74	0,74	0,39	10

5

Tabla 6. Efecto de la Fórmula (III), Carboplatino y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células BT-549

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Carboplatino
Fórmula (III) (nM)	Carboplatino (nM)	Fórmula (III) (nM) + Carboplatino (nM)	Fórmula (III)		Carboplatino		Fórmula (III) + Carboplatino			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0		100,00	8,66	100,00	8,66	100,00	8,66		
120	80	120 + 80	75,49	3,62	37,09	2,38	25,89	9,56	1,04	1,5
180	120	180 + 120	63,69	1,80	21,43	0,23	12,16	7,96	0,81	1,5
240	160	240 + 160	44,98	1,24	19,39	5,74	11,19	0,32	1,01	1,5
300	200	300 + 200	31,92	0,39	15,69	1,86	4,58	7,13	0,66	1,5

Tabla 7. Efecto de la Fórmula (III), Cisplatino y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células BT-549

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Cisplatino
Fórmula (III) (nM)	Cisplatino (nM)	Fórmula (III)(nM) + Cisplatino (nM)	Fórmula (III)		Cisplatino		Fórmula (III) + Cisplatino			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0		100,00	8,66	100,00	8,66	100,00	8,66		
120	80	120 + 80	75,49	3,62	63,96	5,29	49,25	0,03	1,26	1,5
180	120	180 + 120	63,69	1,80	46,37	3,85	39,10	2,01	1,54	1,5
240	160	240 + 160	44,98	1,24	38,19	1,98	22,87	1,56	1,41	1,5
300	200	300 + 200	31,92	0,39	19,56	4,94	13,10	0,71	1,27	1,5

5 **Tabla 8.** Efecto de la Fórmula (III), Vinorelbina y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células BT-549

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Vinorelbina
Fórmula (III) (nM)	Vinorelbina (nM)	Fórmula (III) (nM) + Vinorelbina (nM)	Fórmula (III)		Vinorelbina		Fórmula (III) + Vinorelbina			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	9,00	100,00	9,00	100,00	9,00		
200	1	200 + 1	98,48	0,11	94,16	3,11	69,99	4,17	1,11	200
260	1,3	260 + 1,3	92,90	3,58	91,71	0,99	76,47	5,91	1,55	200
300	1,6	300 + 1,6	78,02	1,98	74,36	3,22	55,70	1,80	1,48	187,5
380	1,9	380 + 1,9	75,85	1,97	62,84	3,77	48,07	4,92	1,69	200

Tabla 9. Efecto de la Fórmula (III), Docetaxel y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células BT-549

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Docetaxel
Fórmula (III) (nM)	Docetaxel (nM)	Fórmula (III) (nM) + Docetaxel (nM)	Fórmula (III)		Docetaxel		Fórmula (III) + Docetaxel			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	7,51	100,00	7,51	100,00	7,51		
100	0,4	100 + 0,4	68,75	6,81	82,04	4,65	68,41	12,15	1,49	250
200	0,8	200 + 0,8	72,14	1,41	36,11	14,39	26,46	2,85	0,68	250
300	1,2	300 + 1,2	55,86	3,99	36,45	4,44	17,46	2,77	0,67	250
400	1,6	400 + 1,6	36,26	1,26	36,13	1,17	10,45	1,20	0,57	250

5

Tabla 10. Efecto de la Fórmula (III), Olaparib y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células BT-549

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Olaparib
Fórmula (III) (nM)	Olaparib (nM)	Fórmula (III) (nM) + Olaparib (nM)	Fórmula (III)		Olaparib		Fórmula (III) + Olaparib			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	7,73	100,00	7,73	100,00	7,73		
100	10	100 + 10	90,84	7,25	81,09	5,02	84,18	6,85	1,71	10
200	20	200 + 20	71,37	0,58	77,20	3,63	60,99	1,43	1,33	10
300	30	300 + 30	62,75	6,10	74,16	7,24	31,32	4,14	0,83	10
400	40	400 + 40	38,46	1,48	45,10	3,15	20,86	3,77	0,77	10

Tabla 11. Efecto de la Fórmula (III), Carboplatino y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células HS578T

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (II)/Carboplatino
Fórmula (III) (nM)	Carboplatino (nM)	Fórmula (III) (nM) + Carboplatino (nM)	Fórmula (III)		Carboplatino		Fórmula (III) + Carboplatino			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0		100,00	8,45	100,00	8,45	100,00	8,45		
120	80	120 + 80	74,88	6,57	70,90	6,75	50,03	7,27	1,04	1,5
180	120	180 + 120	67,47	4,70	60,26	1,59	29,33	5,88	0,94	1,5
240	160	240 + 160	50,84	2,81	50,49	7,80	1,70	4,64	0,21	1,5
300	200	300 + 200	46,83	4,43	24,33	1,35	6,00	4,45	0,54	1,5

5 **Tabla 12.** Efecto de la Fórmula (III), Cisplatino y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células HS578T

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Cisplatino
Fórmula (III) (nM)	Cisplatino (nM)	Fórmula (III) (nM) + Cisplatino (nM)	Fórmula (III)		Cisplatino		Fórmula (III) + Cisplatino			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0		100,00	8,45	100,00	8,45	100,00	8,45		
120	80	120 + 80	74,88	6,57	78,97	2,60	64,30	4,58	1,11	1,5
180	120	180 + 120	67,47	4,70	66,89	3,10	40,60	0,60	0,69	1,5
240	160	240 + 160	50,84	2,81	66,34	0,91	34,01	6,68	0,72	1,5
300	200	300 + 200	46,83	4,43	65,19	4,13	21,34	8,81	0,53	1,5

Tabla 13. Efecto de la Fórmula (III), Vinorelbina y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células HS578T

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Vinorelbina
Fórmula (III) (nM)	Vinorelbina (nM)	Fórmula (III) (nM) + Vinorelbina (nM)	Fórmula (III)		Vinorelbina		Fórmula (III) + Vinorelbina			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	7,15	100,00	7,15	100,00	7,15		
200	1	200 + 1	67,80	4,96	44,90	2,43	44,18	2,16	1,46	200
260	1,3	260 + 1,3	59,94	3,02	40,04	1,48	33,73	4,96	0,98	200
300	1,6	300 + 1,6	52,24	0,58	38,48	0,34	29,29	0,08	0,91	187,5
380	1,9	380 + 1,9	48,91	0,27	36,67	1,33	28,99	1,42	1,06	200

5 **Tabla 14.** Efecto de la Fórmula (III), Docetaxel y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células HS578T

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Docetaxel
Fórmula (III) (nM)	Docetaxel (nM)	Fórmula (III) (nM) + Docetaxel (nM)	Fórmula (III)		Docetaxel		Fórmula (III) + Docetaxel			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	4,54	100,00	4,54	100,00	4,54		
100	0,4	100 + 0,4	76,19	0,35	73,02	2,67	63,38	2,84	1,01	250
200	0,8	200 + 0,8	72,37	17,19	49,65	9,03	43,24	6,83	0,67	250
300	1,2	300 + 1,2	66,27	0,15	45,83	0,51	29,78	0,66	0,47	250
400	1,6	400 + 1,6	57,40	0,99	47,86	1,69	27,13	1,38	0,53	250

Tabla 15. Efecto de la Fórmula (III), Olaparib y combinaciones de los mismos sobre la inhibición de la proliferación de células HS578T

Cantidad del fármaco			Porcentaje de inhibición						Índice de combinación	Proporción de Fórmula (III)/Olaparib
Fórmula (III) (nM)	Olaparib (nM)	Fórmula (III) (nM) + Olaparib (nM)	Fórmula (III)		Olaparib		Fórmula (III) + Olaparib			
			media	DT	media	DT	media	DT		
0	0	0	100,00	4,31	100,00	4,31	100,00	4,31		
100	10	100 + 10	93,48	4,49	89,66	4,32	83,31	2,57	1,14	10
200	20	200 + 20	77,62	0,12	77,84	1,50	52,72	4,47	0,62	10
300	30	300 + 30	72,28	1,37	73,05	0,79	45,64	18,89	0,73	10
400	40	400 + 40	66,61	2,64	70,62	4,75	35,56	1,43	0,68	10

5 c) Efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis

Para identificar el mecanismo de acción de la Fórmula (III), se exploró el efecto del fármaco en el ciclo celular y en la inducción de la apoptosis. Con este fin, se trataron HS578T, BT549 y MDA-MB-231 con la Fórmula (III) a 500 nM o Fórmula (III) en combinación con un agente quimioterapéutico analizado usando el flujo tras la incubación. Se observó que la Fórmula (III) indujo una fuerte detención en la fase G2/M, más pronunciada a las 24 h (incremento de 15 %, 22 % y 18 % para HS578T, BT549 y MDA_MB231, respectivamente, Figura 5A).

También se usó la tinción con Anexina V para explorar el efecto de la Fórmula (III) sobre la apoptosis, mediante lo que se observó un aumento a las 48 horas, más evidente en HS578T (Figura 5B). Del mismo modo, la activación (fosforilación) de las tirosina quinasas receptoras y de las quinasas intracelulares por la Fórmula (III) se confirmó mediante Western Blot, en la que se demostró que dicho compuesto inhibe componentes de la vía PI3K/mTOR/AKT y JAK/STAT (Figura 6).

Se evaluó el efecto de la combinación de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, tales como docetaxel y carboplatino, con los compuestos de acuerdo con la presente invención, tales como la Fórmula (III), sobre la apoptosis. La administración de la Fórmula (III) con carboplatino indujo la apoptosis claramente a las 48 h (véase la Figura 7). Se observó un efecto similar, pero menos evidente, con el docetaxel (véase la Figura 7). Estos hallazgos sugieren que la adición de algunas quimioterapias a la Fórmula (III) produjo un aumento de la muerte celular que no se obtuvo con el inhibidor de quinasa solo.

Como los agentes de daño del ADN, tales como los compuestos de platino, y los agentes dirigidos a la tubulina, tales como los taxanos, inducen la apoptosis mediante la producción de roturas en las cadenas de ADN, se examinó el efecto de estas combinaciones en γ H2AX, un marcador de rotura de dobles cadenas [FEBS Lett. 2010; 584:3717-3724].

Entre las razones que producen una detención en la fase G2/M está la presencia de lesiones en el ADN y el posterior intento de reparar y mantener su integridad. Para investigar si la explicación molecular detrás de la inhibición de la transición de G2/M es secundaria al daño del ADN, se analizaron los niveles de γ H2AX fosforilado. Se sabe que esta proteína es necesaria para la detención del ciclo celular mediada por puntos de control y la reparación del ADN tras roturas de la doble cadena de ADN. El tratamiento con la Fórmula (III) en HS578T mostró un aumento en los niveles de γ H2AX fosforilado de una manera dependiente del tiempo (Figura 8). En respuesta a las roturas de la doble cadena de ADN (DSBs), ATM fosforila varios sustratos, incluyendo, Chk2, p53 y γ H2AX. Se observó que la Fórmula (III) indujo la fosforilación de p53 y de chk2, lo que sugiere que la Fórmula (III) induce la detención en G2/M mediante la producción de daño en el ADN. Los análisis de proteínas del ciclo celular también mostraron que la ciclina D y la ciclina A, reguladores de la fase G1/S, se regularon negativamente tras el tratamiento con la Fórmula (III). El aumento observado en ciclina B y p-Cdc2 confirmó la detención en G2 (Figura 8). En general, estos resultados muestran que el tratamiento con la Fórmula (III) induce daño en el ADN que causa la detención del ciclo celular en un intento de la célula para mantener la integridad del ADN.

Como se muestra en la Figura 9, la administración de la Fórmula (III) con docetaxel o carboplatino aumentó γ H2AX en comparación con cada agente administrado solo, demostrando así que la administración concomitante de ambos fármacos aumenta el efecto sobre la integridad del ADN.

5 En los experimentos descritos en el presente documento, las dosis del fármaco en el intervalo nanomolar fueron capaces de producir la inhibición del crecimiento y una reducción de la formación de colonias en un grupo de líneas celulares de TNBC a la misma dosis que inhibieron la eficiencia de las rutas mencionadas. Cuando se combinó con quimioterapias, la Fórmula (III) produjo un efecto sinérgico con, en particular, los compuestos de platino y docetaxel, volviendo así a estos agentes clínicamente aplicables. Cabe señalar que estas dos quimioterapias son hitos en el
10 tratamiento de esta enfermedad.

15 Cuando se evaluó el mecanismo de acción, se observó que la administración de la Fórmula (III) en cortos períodos de tiempo indujo daño en el ADN medido por la fosforilación de γ H2AX y de otras proteínas incluyendo la forma fosforilada de p53 y Chk2; todas efectoras de ATM y ATR aguas abajo en respuesta a los ataques al ADN [*Nature reviews* 2000; 1: 179-186, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2000; 97: 10389-10394]. En períodos más largos de tiempo, se observó un aumento de la expresión de los genes implicados en la reparación del ADN; genes que probablemente se sintetizaron en respuesta a un ataque al ADN. Esta observación se confirmó mediante RT-PCR de los genes regulados positivamente incluyendo BRCA2, BRCA1, DDB2, FANCE, LIG4, GADD45, PRMT6, RAD52 o XPA, entre otros. El aumento de la expresión de la apoptosis que se observó a las 48 horas sugirió que las células que no pueden reparar el ADN se sometieron a la muerte celular, y este efecto se reforzó cuando se administró la Fórmula (III) en combinación con quimioterapia.

25 A nivel global, la combinación del inhibidor de quinasas de Fórmula (III) de la presente invención con agentes quimioterapéuticos seleccionados entre carboplatino, docetaxel y olaparib produjo un aumento en la apoptosis secundario a una inducción de daño en el ADN. Además, la Fórmula (III) es sinérgica con los agentes quimioterapéuticos seleccionados entre carboplatino, docetaxel y olaparib usados actualmente en el tratamiento del TNBC, y se ha demostrado que dichas combinaciones sinérgicas son estables en soluciones de modelos *in vivo*, haciendo así que dichas combinaciones sinérgicas sean adecuadas para su uso en el ámbito clínico y, por lo tanto,
30 aplicables a nivel industrial.

Listado de secuencias

<110> EntreChem S.L.

35 <120> Actividad antitumoral de inhibidores de múltiples quinasas en el cáncer de mama triple negativo

<130> EP-06844

40 <160> 20

<170> BiSSAP 1.3

45 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Cebador directo de GADPH para PCR

<400> 1

caatgacccc tcattgacc 20

55 <210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Cebador inverso de GADPH para PCR

<400> 2

gatctcgctc ctggaagatg 20

65 <210> 3

ES 2 611 486 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador directo de XPA para PCR

<400> 3
gcagcccca agataattga 20

10 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador inverso de XPA para PCR

<400> 4
tggcaaatca aagtgttca 20

20 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Cebador directo de GADD45 para PCR

30 <400> 5
ggaggaagtg ctcagcaaag 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Cebador inverso de GADD45 para PCR

40 <400> 6
tggatcaggg tgaagtgat 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Cebador directo de BRCA1 para PCR

50 <400> 7
actctggggc tctgttca 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Cebador inverso de BRCA1 para PCR

60 <400> 8
ggtgtacat gcacagttgc 20

65 <210> 9

ES 2 611 486 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador directo de BRCA2 para PCR

<400> 9
ccaatgcctc gtaacaacct 20

10 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador inverso de BRCA2 para PCR

<400> 10
agctcttcac cctgcaaaaa 20

20 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Cebador directo de DDB2 para PCR

30 <400> 11
gtgaccacca ttggctact 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Cebador inverso de DDB2 para PCR

40 <400> 12
tcaaggacaa acccacctc 20

45 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo de FANCE para PCR

50 <400> 13
ggactcagtt ccaaccacaa 20

55 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Cebador inverso de FANCE para PCR

<400> 14
gctagtccac tggtctctgg 20

65 <210> 15

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cebador directo de LIG4 para PCR

<400> 15
 gtctgggcct ggatttgta 20

10

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Cebador inverso de LIG4 para PCR

<400> 16
 tgccccaag atgaagaaag 20

20

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Cebador directo de PRMT6 para PCR

30

<400> 17
 ctctcatag ccccatcag 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Cebador inverso de PRMT6 para PCR

40

<400> 18
 aatccctgca caacgatctc 20

45

<210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Cebador directo de RAD52 para PCR

<400> 19
 agtttgga atgcattgg 19

55

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Cebador inverso de RAD52 para PCR

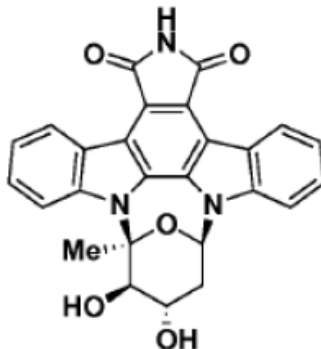
<400> 2
 tcggcagctg ttgatcttg 20

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

5 a) un compuesto de Fórmula (III)



Fórmula (III)

y

b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, docetaxel y olaparib.

10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es carboplatino.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es docetaxel.

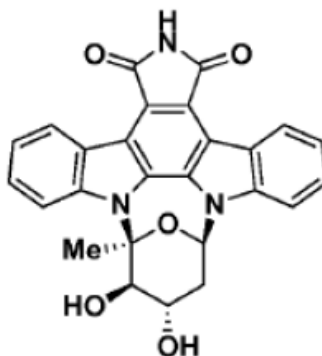
15 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un agente quimioterapéutico es olaparib.

20 5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición es una composición farmacéutica.

6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del cáncer de mama en un paciente.

25 7. Un método de producción de una composición farmacéutica que comprende mezclar:

a) un compuesto de Fórmula (III)



Fórmula (III)

y

30 b) al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre carboplatino, docetaxel y olaparib.

Figura 1

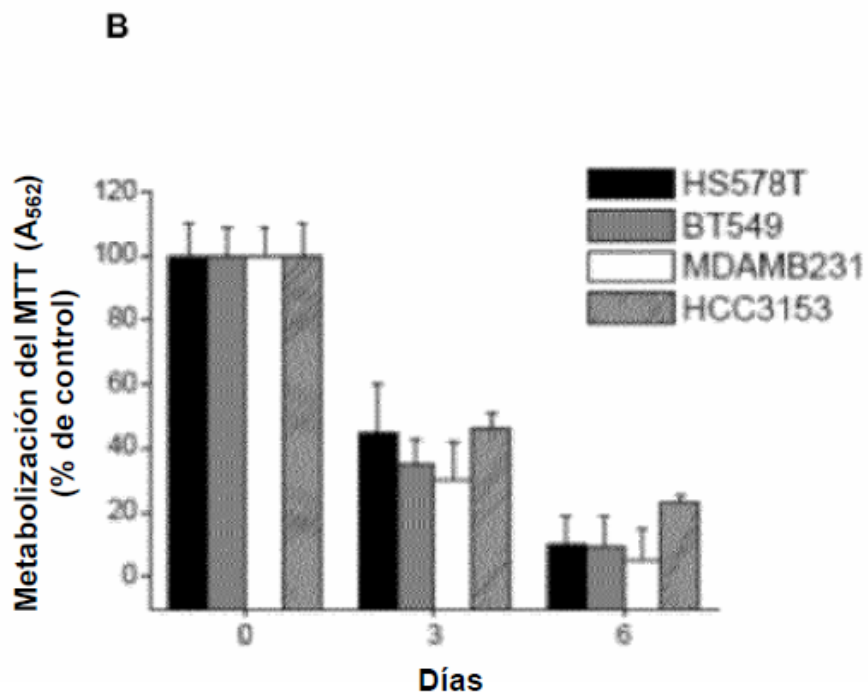
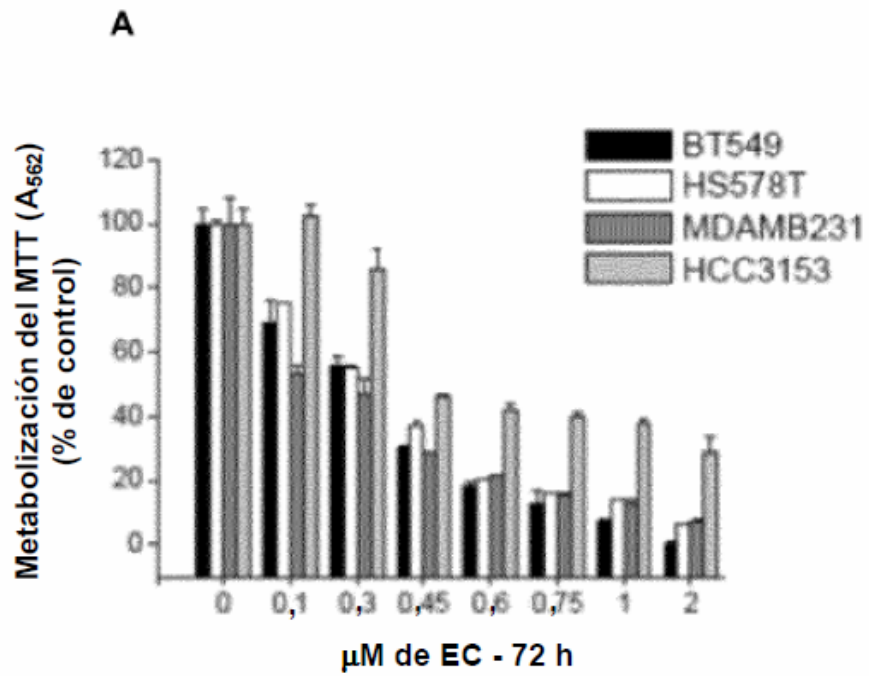


Figura 2

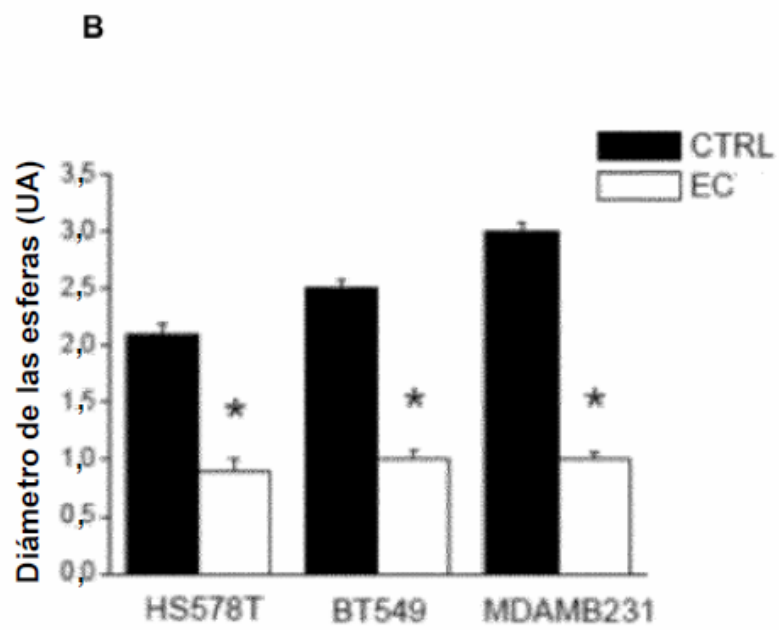
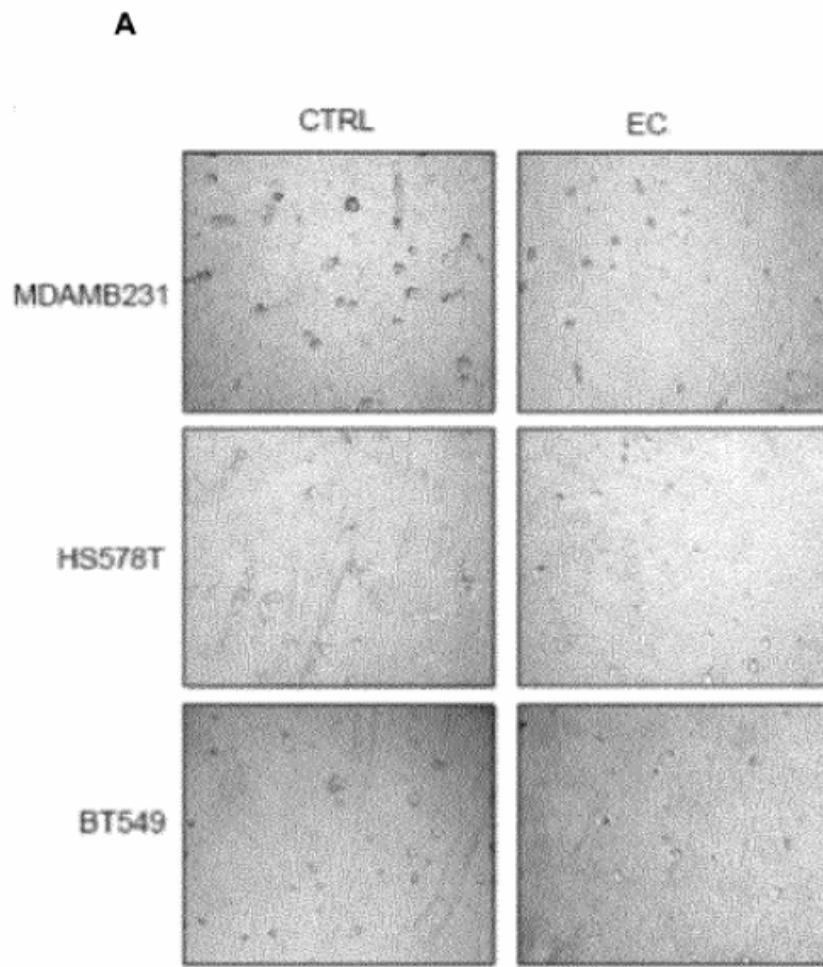


Figura 3

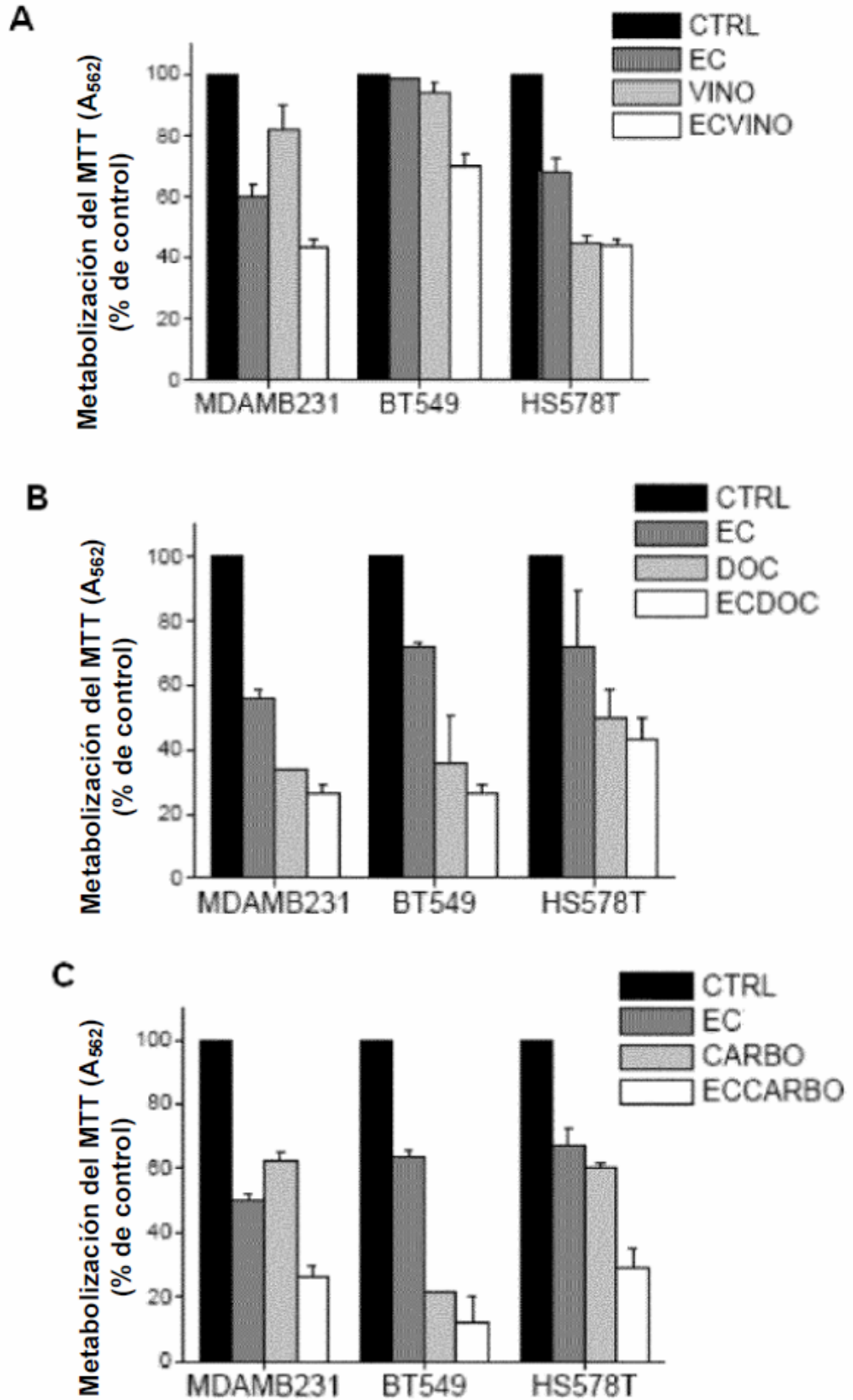


Figura 4

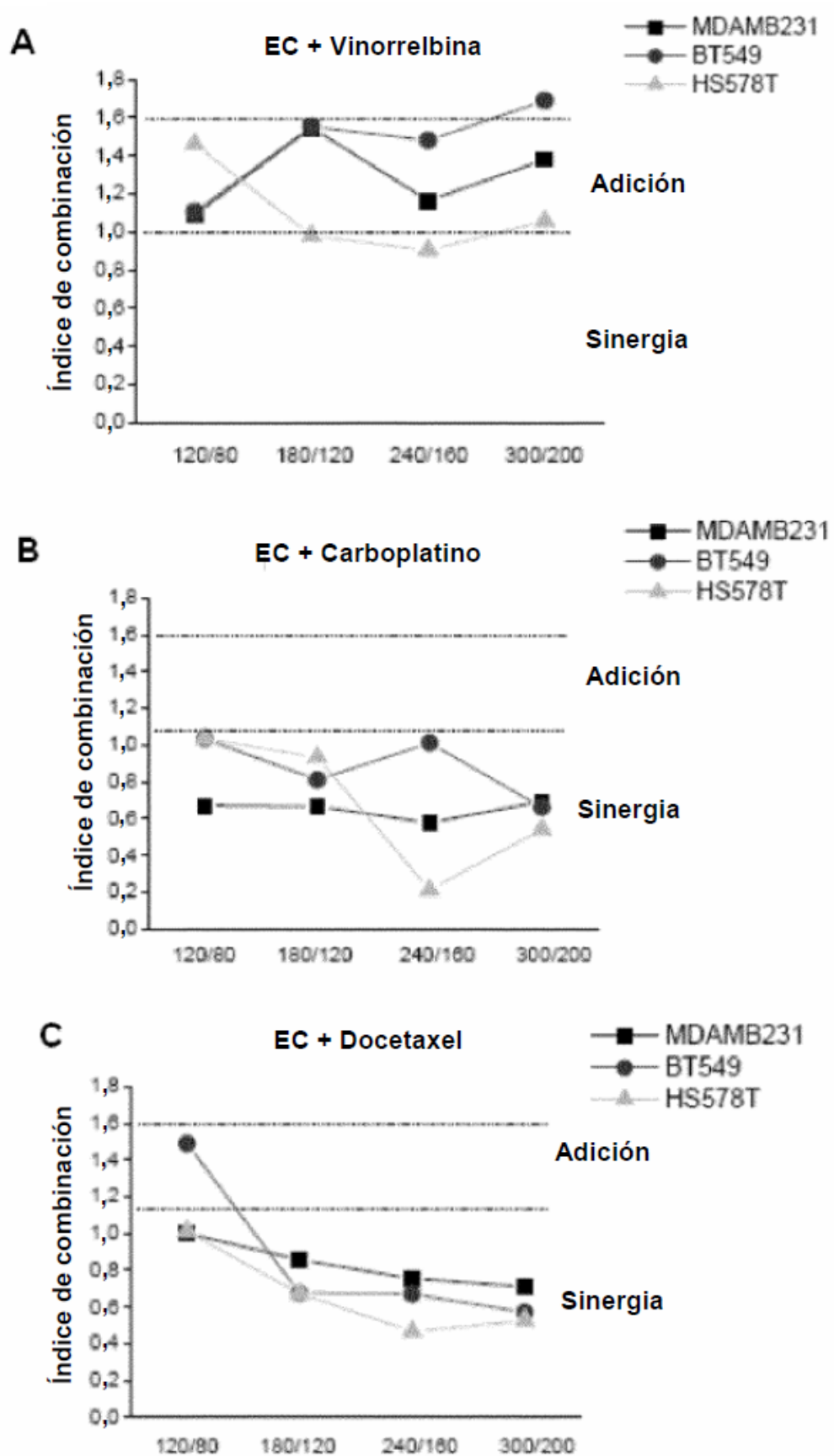


Figura 5

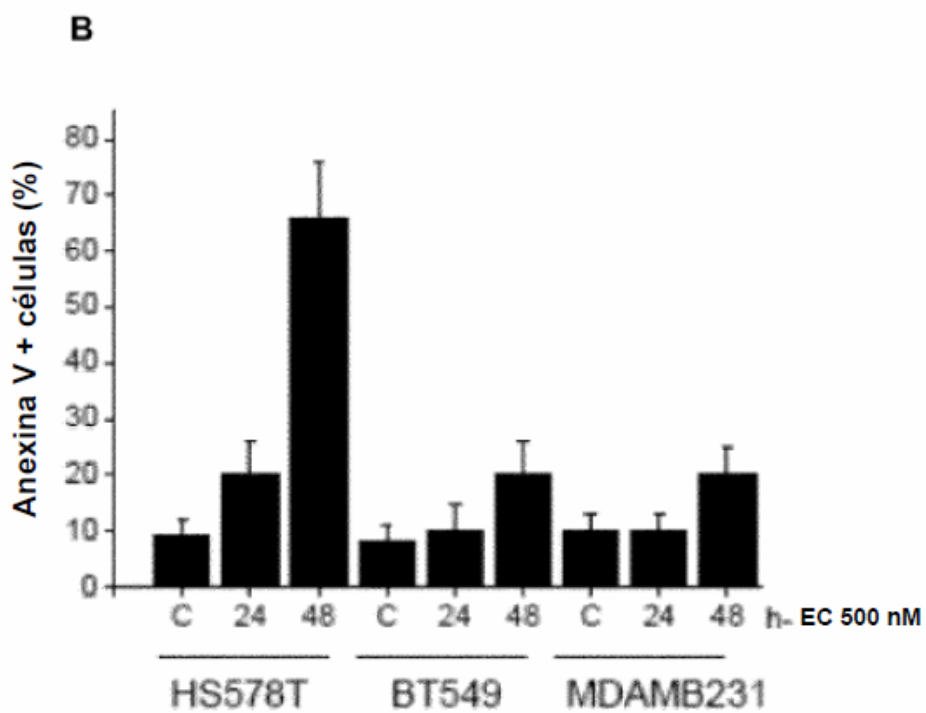
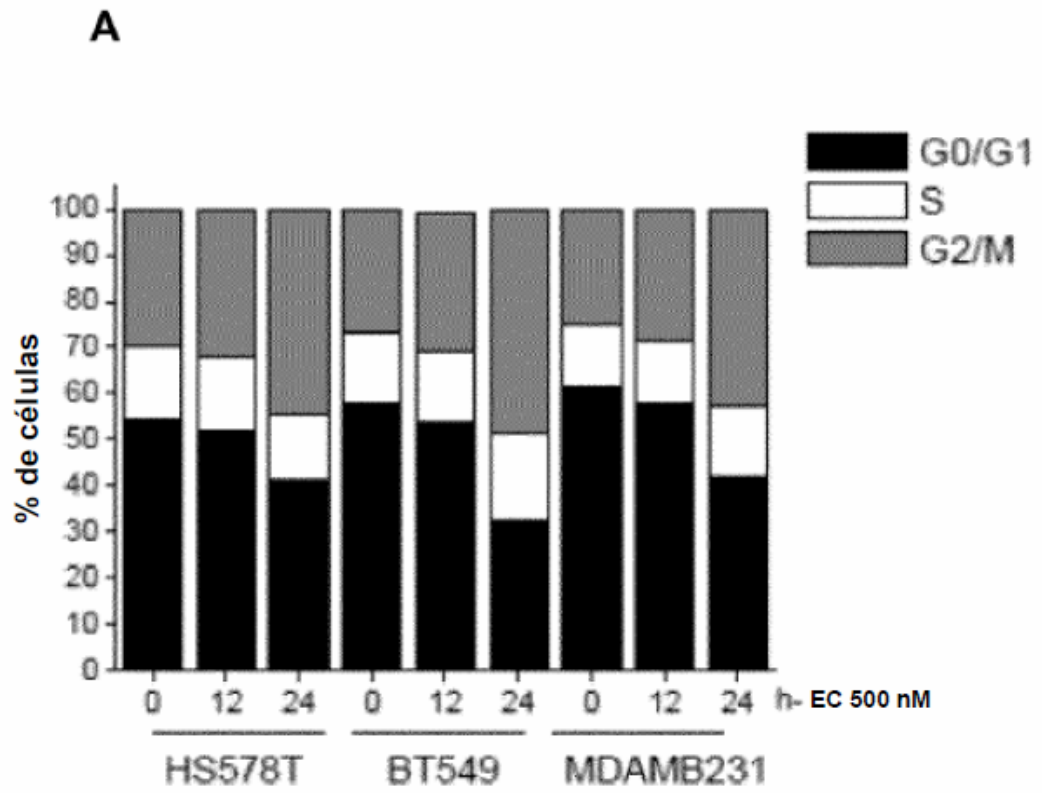


Figura 6

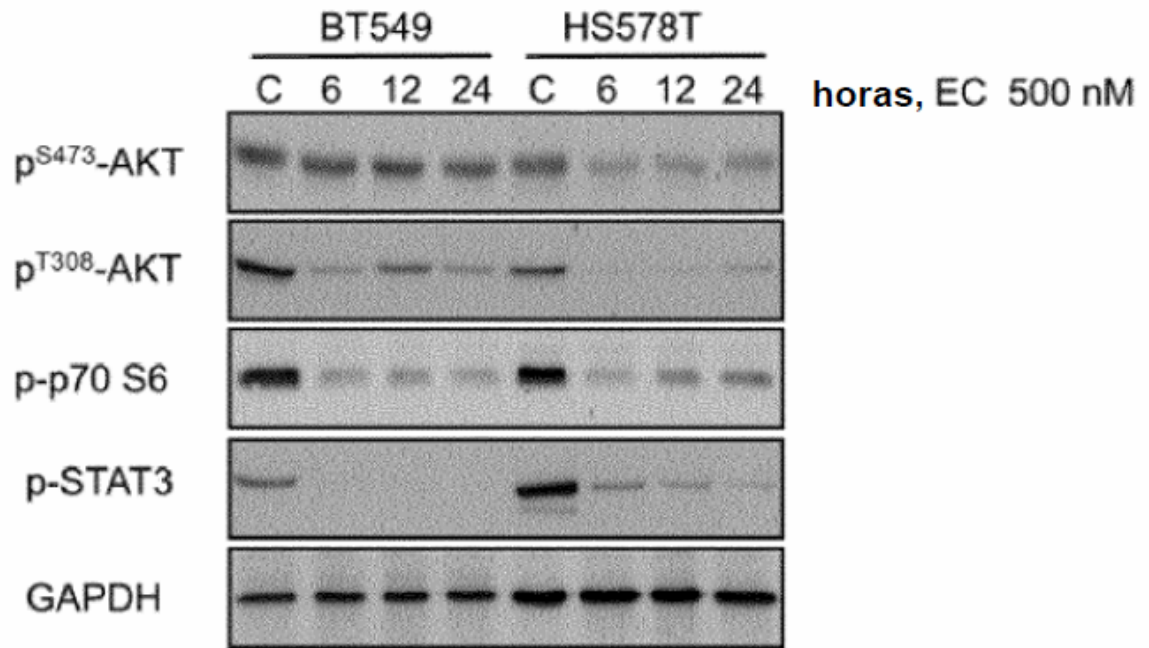


Figura 7

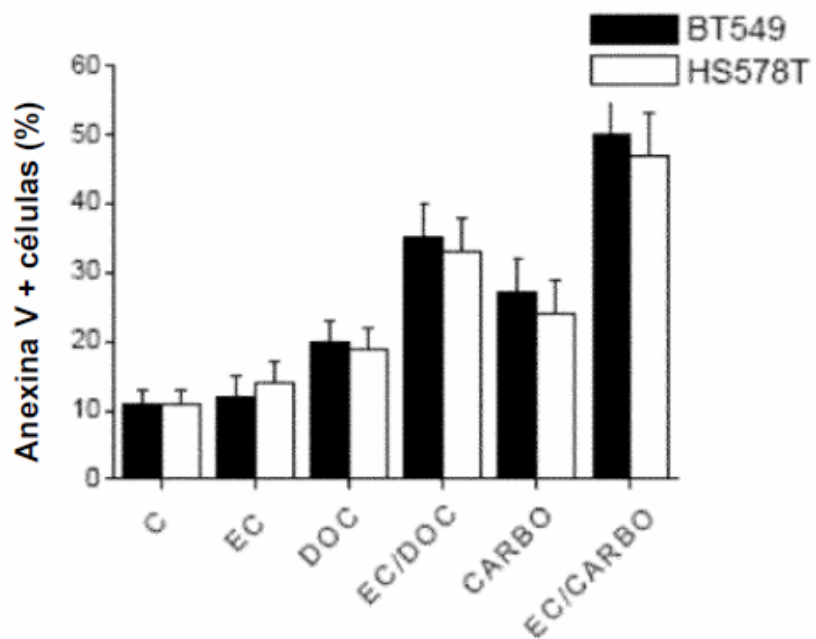


Figura 8

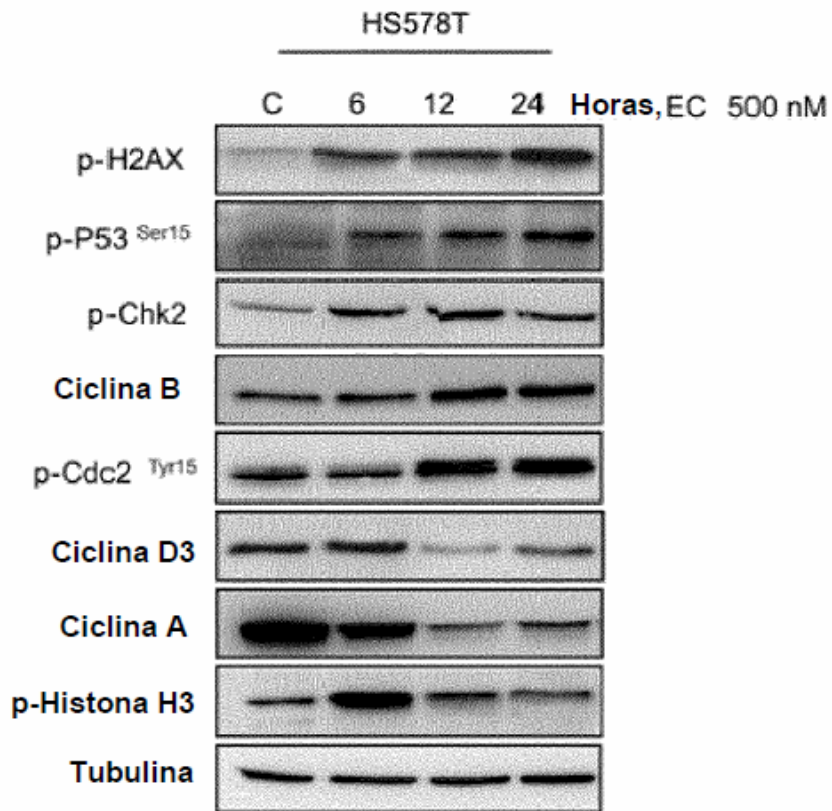
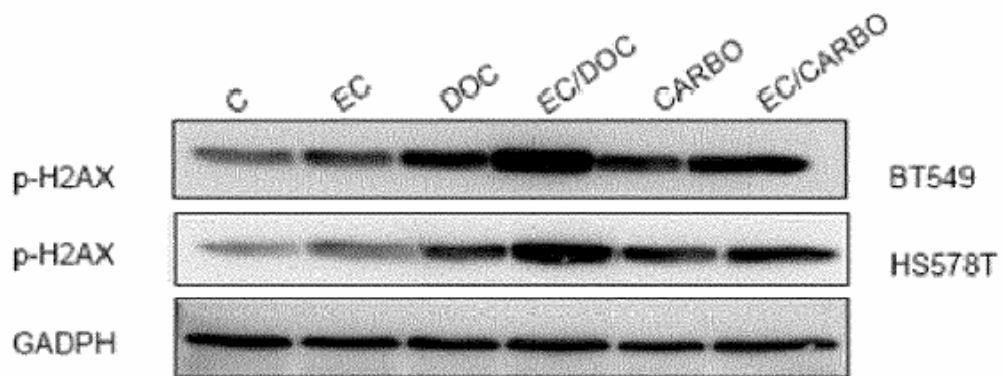


Figura 9



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 2277885 A1 [0003]
- EP 06844 A [0061]

10 **Literatura no patente citada en la descripción**

- *Cancer Cell*, 2007, vol. 11, 259-273 [0002]
- *Cell*, 2011, vol. 144, 646-674 [0002]
- *Nature*, 2000, vol. 406, 747-752 [0002]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, vol. 98, 10869-10874 [0002]
- *Clin. Cancer Res.*, 2004, vol. 10, 5367-5374 [0002]
- *Cell*, 2011, vol. 144, 703-718 [0002] [0003]
- *Oncogene*, 2013, vol. 33, 148-156 [0002]
- *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13, 4429-4434 [0002]
- *Clin. Cancer Res.*, 2013, vol. 19, 5533-5540 [0002]
- *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, 2750-2767 [0002] [0004]
- *Cancer Treat. Rev.*, 2013, vol. 39, 68-76 [0002]
- *Lancet Oncol.*, 2007, vol. 8, 235-244 [0002]
- *Oncogene*, 2014, vol. 33, 148-156 [0003]
- *Cell*, 1990, vol. 61, 203-212 [0003]
- *Cell*, 2000, vol. 103, 211-225 [0003]
- *Cancer Res.*, 2013, vol. 73, 6346-6358 [0003]
- *J. Clin. Oncol.*, 2013, vol. 31, 2586-2592 [0003]
- *Nature*, 2012, vol. 486, 395-399 [0003]
- *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, vol. 95, 1482-1485 [0004]
- *Nat. Rev. Cancer*, 2004, vol. 4, 814-819 [0004]
- *Science*, 2013, vol. 341, 395-9 [0004]
- *EMBO Mol. Med.*, 2009, vol. 1, 315-322 [0004]
- *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010, vol. 102, 1432-1446 [0004]
- *Chem. Commun. (Camb.)*, 2009, 4118-20 [0021]
- *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, 2723-2735 [0021]
- **CHOU ; TALALAY.** *Cancer Res.*, 2010, vol. 70, 440-446 [0037]
- *Cancer Res.*, 2010, vol. 70, 440-446 [0051]
- *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, 3717-3724 [0055]
- *Nature reviews*, 2000, vol. 1, 179-186 [0059]
- *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, vol. 97, 10389-10394 [0059]