

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 270**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 31/4025** (2006.01)  
**A61K 31/4412** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61K 31/517** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2012 PCT/IB2012/052698**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164497**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2012 E 12738184 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2714031**

54 Título: **Combinación farmacéutica sinérgica para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello**

30 Prioridad:

**31.05.2011 US 201161491569 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.09.2018**

73 Titular/es:

**PIRAMAL ENTERPRISES LIMITED (100.0%)  
Piramal Tower Ganpatrao Kadam Marg Lower  
Parel  
Mumbai 400 013, IN**

72 Inventor/es:

**AGARWAL, VEENA;  
BALAKRISHNAN, ARUN y  
PERIYASAMY, GIRIDHARAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 682 270 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

Combinación farmacéutica sinérgica para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

**Campo de la invención:**

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado de los compuestos de Fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más agentes antineoplásicos para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN). La combinación farmacéutica de la presente invención muestra sinergia cuando se usa en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN). Por lo tanto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica sinérgica. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende dicha combinación.

**Antecedentes de la invención:**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el control inusual del crecimiento celular. Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, que se clasifican por el tipo de células inicialmente afectadas, tales como el cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón (células renales), leucemia, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de la piel, linfoma no hodgkin y melanoma y cáncer de cabeza y cuello. El carcinoma de células escamosas representa más del 90% de todos los cánceres de cabeza y cuello. Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello constituyen la gran mayoría de los cánceres de cabeza y cuello, y surgen de superficies mucosas en toda la región anatómica. Estos incluyen tumores de las cavidades nasales, senos paranasales, cavidad oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe.

De hecho, el cáncer de cabeza y cuello (HNC) es el sexto cáncer más común en el mundo, con una incidencia anual de >640,000 casos en todo el mundo. Más del 90% de los cánceres de cabeza y cuello son de histología escamosa (HNSCC). Entre el 35 y el 45% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello finalmente mueren a causa de su enfermedad. Solo en los Estados Unidos, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello comprende aproximadamente el 4% de todas las enfermedades malignas. Esto corresponde a una estimación de 17 por 100,000 personas con carcinoma de células escamosas recientemente diagnosticado de cabeza y cuello por año (Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. *Cancer statistics, 2008, CA Cancer J. Clin.* 2008 Mar-Abr; 58 (2):71-96). El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) sigue siendo un problema clínico desafiante, debido a la alta tasa persistente de fracaso local y distante, así como a la aparición de segundas primarias. Algunas terapias dirigidas a dianas moleculares usadas en cánceres de células escamosas de cabeza y cuello incluyen el cetuximab, bevacizumab, erlotinib y reovirus. Los mejores datos de calidad están disponibles para el cetuximab, un anticuerpo monoclonal recombinante, desde la publicación en 2006 de un ensayo clínico aleatorizado que comparó el tratamiento con radiación más cetuximab versus la radioterapia sola ("Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck". *N Engl J Med* 2006; 354 (6): 567-78). Otro estudio evaluó el impacto de agregar cetuximab a la quimioterapia convencional lo que implica cetuximab con cisplatino versus el uso de cisplatino solo. Este estudio no encontró ninguna mejora en la supervivencia o supervivencia libre de enfermedad con la adición de cetuximab a la quimioterapia convencional (*J Clin Oncol.* 2005; 23 (34): 8646-54). Sin embargo, otro estudio completado en marzo de 2007 encontró que hubo una mejora en la supervivencia. Este estudio se conoce como EXTREME (estudio de Erbitux en el tratamiento de primera línea de cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico), que fue un ensayo europeo multicéntrico de fase III. Además, está bien establecido en la técnica que los inhibidores de CDK (quinasa dependiente de ciclina) son útiles en terapias antiproliferativas para enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular excesivo tales como cánceres y trastornos inmunológicos que implican la proliferación no deseada de leucocitos. Derivados de flavona útiles como inhibidores de CDK se describen en el documento de patente PCT N° documento de patente internacional WO2004-004632 (documento de patente de Estados Unidos 7.271.193) cuya solicitud de patente se refiere específicamente a compuestos para la inhibición de quinasas dependientes de ciclina, proceso para su preparación, métodos de inhibición de quinasas dependientes de ciclina y de inhibición de la proliferación celular, y uso de tales compuestos en el tratamiento de trastornos proliferativos incluyendo cánceres. La solicitud de patente PCT publicada N° documento de patente internacional WO2005-053699 (documento de patente de Estados Unidos 7.772.207) se refiere a un producto farmacéutico que comprende un inhibidor de CDK y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-p-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina o un metabolito del mismo, como una preparación combinada para administración simultánea, secuencial o separada. La solicitud de patente PCT publicada N° documento de patente internacional WO2008-122779 (solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2010-0143350) describe la combinación de inhibidor de CDK con un inhibidor de tirosina quinasa y su uso en el tratamiento de trastornos proliferativos. La solicitud de patente PCT publicada N° documento de patente internacional WO2008-139271 (solicitud de patente de Estados Unidos publicada 2010-0305057) se refiere a una combinación farmacéutica que comprende un agente antineoplásico citotóxico seleccionado de paclitaxel, docetaxel, doxorubicina o gemcitabina y al menos un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) para uso en el tratamiento del cáncer. La solicitud de patente PCT publicada N° documento de patente internacional WO2010-128443 describe una combinación para el tratamiento del cáncer en donde la combinación comprende radiación y al menos un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Aunque se ha demostrado que las combinaciones de agentes anticancerígenos son un avance significativo en varios protocolos de tratamiento del cáncer, incluido el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), todavía hay varias necesidades insatisfechas y posibilidades de mejora de los medicamentos para el tratamiento de SCCHN, que es difícil de tratar, o que ha mostrado resistencia al tratamiento con los agentes antineoplásicos convencionales. Más particularmente, el desarrollo de un nuevo enfoque de combinación para suministrar agentes anticancerígenos conocidos que tengan diferentes mecanismos de acción representaría un avance importante en la técnica. Aunque el protocolo que implica la combinación de agentes anticancerígenos que tienen diferentes mecanismos de acción puede funcionar en el caso de algunas combinaciones, puede no funcionar de la misma manera para otra combinación de agentes anticancerígenos y tal combinación puede no siempre dar como resultado una combinación que tenga efectos terapéuticos ventajosos. Sin embargo, los inventores de la presente invención han descubierto que una combinación farmacéutica de agentes anticancerígenos que comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) y uno o más agentes antineoplásicos proporciona una mayor eficacia que cuando los inhibidores de CDK o los agentes antineoplásicos se usan solos en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

#### 15 **Compendio de la invención:**

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), que comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado de los compuestos de Fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN), que comprenden una combinación de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de Fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, junto con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otros aspectos y el alcance adicional de aplicabilidad de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue.

#### **Breve descripción de los dibujos:**

30 La figura 1a es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de sorafenib y lapatinib en células SCC25.

La figura 1b es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación del compuesto A y el compuesto B en células SCC25.

35 La figura 2a es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de sorafenib y lapatinib en células Detroit-562.

La figura 2b es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación del compuesto A y el compuesto B en células Detroit-562.

La figura 3a es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de sorafenib y lapatinib en células FADU.

40 La figura 3b es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación del compuesto A y el compuesto B en células FADU.

La figura 4a es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de erlotinib en células Detroit-562.

45 La figura 4b es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de erlotinib en células FADU.

La figura 5a es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel en células Detroit-562.

La figura 5b es una representación gráfica de los resultados de inhibición porcentual de la dosificación de cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel en células FADU.

50 La figura 6a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y sorafenib en células SCC-25.

- La figura 6b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto B y sorafenib en células SCC-25.
- La figura 7a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y sorafenib en células Detroit-562.
- 5 La figura 7b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto B y sorafenib en células Detroit-562.
- La figura 8a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y sorafenib en células FADU.
- 10 La figura 8b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto B y sorafenib en células FADU.
- La figura 9a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y lapatinib en células SCC-25.
- La figura 9b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto B y lapatinib en células SCC-25.
- 15 La figura 10a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y lapatinib en células Detroit-562.
- La figura 10b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto B y lapatinib en células Detroit-562.
- 20 La figura 11a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y lapatinib en células FADU.
- La figura 11b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto B y lapatinib en células FADU.
- La figura 12a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y erlotinib en células Detroit-562.
- 25 La figura 12b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A y erlotinib en células FADU.
- La figura 13a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A, cisplatino y 5-FU en células Detroit-562.
- 30 La figura 13b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A, cisplatino y 5-fluorouracilo en células FADU.
- La figura 14a es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A, docetaxel, cisplatino y 5-FU en células Detroit-562.
- La figura 14b es una representación gráfica de los resultados de citotoxicidad porcentual de la dosificación única y combinada del compuesto A, docetaxel, cisplatino y 5-FU en células FADU.
- 35 La figura 15a es una representación gráfica de la activación de la caspasa 3 en células SCC-25 con dosificación única y combinada de sorafenib y el compuesto A.
- La figura 15b es una representación gráfica de la activación de la caspasa 3 en células SCC-25 con dosificación única y combinada de sorafenib y el compuesto B.
- 40 La figura 16a es una representación gráfica de la activación de la caspasa 3 en células SCC-25 con dosificación única y combinada de lapatinib y el compuesto A.
- La figura 16b es una representación gráfica de la activación de la caspasa 3 en células SCC-25 con dosificación única y combinada de lapatinib y el compuesto B.
- La figura 17a es una representación gráfica del perfil de peso corporal en xenoinjertos de FaDu tratados con dosificación única y combinada del compuesto A, cisplatino y cetuximab.
- 45 La figura 17b es una representación gráfica de la inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjertos de FaDu tratados con dosificación única y combinada del compuesto A, cisplatino y cetuximab.

**Descripción detallada de la invención**

Los términos generales usados en el presente documento anteriormente y en lo sucesivo preferiblemente tienen dentro del contexto de esta descripción los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, las definiciones de los términos generales tal como se usan en el contexto de la presente invención se proporcionan en el presente documento a continuación:

Las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen una referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

La frase "un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK)" o "inhibidor de CDK" como se usa en el presente documento significa un compuesto que exhibe actividad contra una o más quinastas dependientes de ciclina conocidas. En el contexto de la presente invención, el inhibidor de CDK es un compuesto de flavona sustituido con pirrolidina divulgado en el documento de patente N° documento de patente internacional publicado WO2004004632. El inhibidor de CDK según la presente invención se selecciona específicamente de un compuesto de Fórmula I como se describe a continuación en el presente documento o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, el término "inhibidor de CDK" como se usa en el presente documento puede referirse al compuesto de Fórmula I y/o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del compuesto de Fórmula I.

El término "agente antineoplásico" es sinónimo de "agente quimioterapéutico" o "agente anticanceroso" y se refiere a un agente terapéutico que actúa inhibiendo o previniendo el crecimiento de neoplasmas. El término "agente antineoplásico" o "agente anticanceroso" en general se refiere a los compuestos que evitan que las células cancerosas se multipliquen (es decir, los agentes antiproliferativos). En general, los agentes antineoplásicos se clasifican en dos clases, agentes citotóxicos antiproliferativos y agentes citostáticos antiproliferativos. Los agentes citotóxicos evitan que las células cancerosas se multipliquen por medio de: (1) interferencia con la capacidad de la célula para replicar el ADN; y (2) inducción de la muerte celular y/o la apoptosis en las células cancerosas. Los agentes citostáticos actúan modulando, interfiriendo o inhibiendo los procesos de transducción de las señales celulares que regulan la proliferación celular.

La frase "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a la sal de adición de ácido del compuesto de Fórmula I (como se describe en el presente documento) y de un agente antineoplásico, en donde el ácido se selecciona de un ácido inorgánico tal como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico; o un ácido orgánico tal como el ácido bencenosulfónico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido p-toluensulfónico y ácido maleico.

Como se usa en el presente documento, el término "combinación" o "combinación farmacéutica", significa la administración combinada de los agentes anticancerosos, a saber el inhibidor de CDK seleccionado entre los compuestos representados por la Fórmula I y uno o más agentes antineoplásicos abarcados en esta invención que actúan por medio de la inhibición o prevención del crecimiento de neoplasmas o la administración de agentes anticancerosos, a saber, el inhibidor de CDK seleccionado entre los compuestos representados por la Fórmula I y los agentes antineoplásicos seleccionados de agentes citostáticos o citotóxicos; abarcados en esta invención que pueden administrarse independientemente, al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo que permiten especialmente que los socios de combinación muestren un efecto sinérgico.

Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" o "sinergia" significa que el efecto logrado con las combinaciones de agentes anticancerosos abarcados en esta invención es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de agentes anticancerosos, a saber el inhibidor de CDK de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, agente(s) antineoplásico(s) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo(s), como monoterapia. Ventajosamente, tal sinergia proporciona una mayor eficacia a las mismas dosis, y/o previene o retrasa la acumulación de resistencia a múltiples fármacos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz", en referencia al tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello se refiere a una cantidad capaz de invocar uno o más de los siguientes efectos en un sujeto que recibe la combinación de la presente invención: (i) inhibición, hasta cierto punto, del crecimiento tumoral, que incluye la ralentización y detención completa del crecimiento; (ii) reducción en el número de células tumorales; (iii) reducción en el tamaño del tumor; (iv) inhibición (es decir, reducción, ralentización o parada completa) de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (v) inhibición (es decir, reducción, ralentización o parada completa) de metástasis; (vi) mejora de la respuesta inmune antitumoral, que puede, pero no tiene por qué, dar como resultado la regresión del tumor; y/o (vii) alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento. El término sujeto puede usarse indistintamente con el término "paciente" en el contexto de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "simultáneamente" significa que dos o más agentes terapéuticos (agentes anticancerosos) se administran concurrentemente, "secuencialmente" significa que dos o más agentes

terapéuticos están disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo marco de tiempo y "por separado" significa que el espacio entre la administración de un agente y el otro es significativo, es decir, que el primer agente administrado ya puede no estar presente en el torrente sanguíneo en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando se administra el segundo agente.

- 5 El término "actividad de la caspasa-3" tal como se usa en el presente documento se refiere al aumento de la apoptosis en células cancerosas.

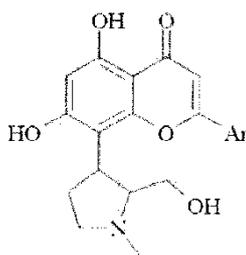
El término "apoptosis" se refiere a un tipo de muerte celular en el que una serie de pasos moleculares en una célula conduce a su muerte. Esta es la manera normal del cuerpo de deshacerse de las células innecesarias o anormales. El proceso de apoptosis puede bloquearse en las células cancerosas. También se llama muerte celular programada. (Diccionario de términos de cáncer, Instituto Nacional del Cáncer). El término "apoptosis creciente" se define como un aumento en la tasa de muerte celular programada, es decir, se inducen más células en el proceso de muerte en comparación con la exposición (contacto) con el agente antineoplásico solo o el inhibidor de CDK solo.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a uno o más agentes disgregantes, aglutinantes, excipientes, lubricantes y similares que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 15 En la presente invención, se proporciona una combinación farmacéutica de agentes anticancerosos para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN). Los presentes inventores han llevado a cabo una extensa investigación para el desarrollo de la combinación farmacéutica de agentes anticancerosos y han llegado a la presente combinación farmacéutica sinérgica. Se ha encontrado que la combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más agentes antineoplásicos seleccionados como se describe en el presente documento exhibe un efecto sinérgico cuando se usa en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (SCCHN).

El inhibidor de CDK es un compuesto de flavona sustituido con pirrolidina que inhibe las quinastas dependientes de ciclina. El inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención se selecciona de los compuestos de Fórmula I o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos como se describe a continuación en el presente documento. Los compuestos de fórmula I son inhibidores de CDK prometedores, que pueden inhibir la proliferación de muchas células cancerosas. Como se indicó anteriormente en el presente documento, los inhibidores de CDK de fórmula (I) pueden usarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales abarcadas dentro del término "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de esta invención. Sales representativas incluyen, pero sin limitación, el acetato, benzoato, bencenosulfonato, bicarbonato, cloruro, citrato, hidrocloreuro, mesilato, metilsulfonato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato. Las sales preferidas de los compuestos de fórmula (I) incluyen la sal de hidrocloreuro, ácido metanosulfónico y sal de ácido trifluoroacético.

- 35 En una forma de realización, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención se selecciona de los compuestos representados por la siguiente fórmula I,

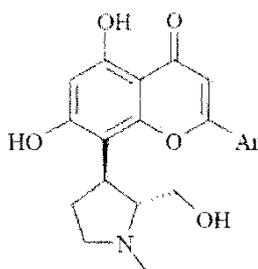


Formula I

en donde, Ar es un grupo fenilo, que está sin sustituir o sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de: halógeno, nitro, ciano, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, trifluorometilo, hidroxilo y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 40 Como se indicó anteriormente en este documento, las sales del inhibidor de CDK se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de fórmula (I) de esta invención. Las sales representativas incluyen, pero sin limitación, el acetato, benzoato, bencenosulfonato, bicarbonato, cloruro, citrato, hidrocloreuro, mesilato, metilsulfonato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato. Sales preferidas de los compuestos de fórmula (I) incluyen la sal de hidrocloreuro, ácido metanosulfónico y sal de ácido trifluoroacético.

- 45 En una forma de realización de la invención, el inhibidor de CDK es el (+)-trans isómero del compuesto de fórmula I, como se indica en la fórmula IA a continuación,



Formula IA

en donde Ar es un grupo fenilo, que no está sustituido o está sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre: halógeno, nitro, ciano, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, trifluorometilo, hidroxilo y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En otra forma de realización de la presente invención, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención es un compuesto de fórmula I en donde el grupo fenilo está sustituido con 1, 2 o 3 sustituyentes idénticos o diferentes seleccionados de: cloro, bromo, flúor, yodo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y trifluorometilo; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otra forma de realización de la presente invención, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención es un compuesto de fórmula I en donde el grupo fenilo está sustituido con cloro; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra forma de realización de la presente invención, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención es un compuesto de fórmula I en donde el grupo fenilo está sustituido con dos sustituyentes diferentes seleccionados de cloro y trifluorometilo; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Los expertos en la técnica apreciarán que los inhibidores de CDK representados por los compuestos de Fórmula (I) contienen al menos dos centros quirales y, por lo tanto, existen en forma de dos isómeros ópticos diferentes (es decir, enantiómeros (+) o (-)). Todos tales enantiómeros y mezclas de los mismos, incluidas las mezclas racémicas, están incluidos dentro del alcance de la invención. Los enantiómeros del compuesto de Fórmula I se pueden obtener por métodos divulgados en el documento PCT publicado de la solicitud de patente internacional N° WO2004004632  
20 o los enantiómeros del compuesto de Fórmula I también se pueden obtener por métodos bien conocidos en la técnica, tales como HPLC quiral y resolución enzimática.

Alternativamente, los enantiómeros de los compuestos de fórmula I pueden sintetizarse usando materiales de partida ópticamente activos. La fabricación de los compuestos de fórmula I, que pueden estar en forma de sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, y la fabricación de una composición farmacéutica oral y/o parenteral que  
25 contiene los compuestos anteriores se describen en general en la Publicación de solicitud PCT del documento de patente internacional N° WO2004004632. Esta solicitud de patente describe que los inhibidores de CDK representados por la fórmula I muestran una eficacia anticancerosa significativa. Como se indicó anteriormente en el presente documento, los inhibidores de CDK de fórmula I se pueden usar en forma de sus sales. Sales preferidas de los compuestos de fórmula I incluyen el hidrocloreto, ácido metanosulfónico y sal de ácido trifluoroacético.

30 Según otra forma de realización de la presente invención, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica de la presente invención se selecciona de (+)-*trans*-2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroxi)-metil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona clorhidrato (al que se hace referencia en el presente documento como compuesto A) o (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona clorhidrato (denominado en el presente documento como compuesto B).

35 En una forma de realización de la presente invención, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica es el (+)-*trans*-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona clorhidrato (compuesto A).

40 En una forma de realización adicional de la presente invención, el inhibidor de CDK usado en la combinación farmacéutica es el (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona clorhidrato (compuesto B).

Los agentes antineoplásicos son compuestos que evitan que las células cancerosas se multipliquen (es decir, son agentes antiproliferativos). Los agentes antineoplásicos se pueden seleccionar a partir de agentes citostáticos o citotóxicos.

45 Las moléculas pequeñas tales como sorafenib, lapatinib o erlotinib o un anticuerpo monoclonal quimérico, como el cetuximab, son agentes citostáticos.

El cisplatino, 5-fluorouracilo y/o docetaxel, o sus sales farmacéuticamente aceptables, son agentes citotóxicos.

Según otra forma de realización de la invención, la combinación farmacéutica que comprende un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel puede incluir además el uso de radioterapia para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN).

Los agentes antineoplásicos especificados utilizados en la presente invención están fácilmente disponibles comercialmente.

Sorafenib es un inhibidor de quinasas que disminuye la proliferación de células tumorales *in vitro*. Se ha mostrado que sorafenib inhibió múltiples quinasas intracelulares (CRAF, BRAF y mutantes BRAF) y de superficie celular (KIT, FLT-3, RET, VEGFR-1 a 3 y PDGFR- $\beta$ ). Se cree que varias de estas quinasas están involucradas en la señalización de células tumorales, angiogénesis y apoptosis. Sorafenib inhibió el crecimiento tumoral y la angiogénesis del carcinoma hepatocelular humano y el carcinoma de células renales y varios otros xenoinjertos de tumores humanos en ratones inmunocomprometidos. Se denomina químicamente como 4-(4-{3-[4-cloro-3-(trifluorometil)fenil]ureido}fenoxi)N<sup>2</sup>-metilpiridin-2-carboxamida-4-metilbencenosulfonato. Sorafenib está disponible comercialmente y se comercializa como Nexavar® por Bayer en los Estados Unidos para el tratamiento de pacientes con carcinoma de células renales avanzado (RCC) y aquellos con carcinoma hepatocelular irreseccable (HCC). También está aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos para el tratamiento de pacientes con HCC y pacientes con RCC avanzado con los que el tratamiento previo con IFN- $\alpha$  o con interleucina-2 hubiera fallado o se considera inadecuado para dicha terapia ("Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling". *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7 (10): 3129-40).

Lapatinib es un inhibidor de la 4-anilinoquinazolina quinasa de los dominios tanto de la tirosina quinasa intracelular del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR [ErbB1]) como de los receptores del Receptor Epidérmico humano Tipo 2 (HER2[ErbB2]). Lapatinib inhibe el crecimiento de células tumorales conducidas por ErbB *in vitro* y en varios modelos animales. Está presente como el monohidrato de la sal de ditosilato, con el nombre químico de N-(3-cloro-4-((3-fluorofenil)metil)oxi)fenil)-6-[5-((2-(metilsulfonil)etil)amino)metil]-2-furanil]-4-quinazolinaminabis(4-metilbencenosulfonato)monohidrato. El ditosilato monohidrato es un inhibidor doble de tirosina que interrumpe el receptor de crecimiento HER2 y se usa en terapia de combinación para cáncer de mama HER2-positivo ("Lapatinib in the treatment of breast cancer" *Expert Review of Anticancer Therapy (Future Drugs)* 7 (9): 1183-92). Se comercializa bajo la marca TYKERB® en los Estados Unidos por GlaxoSmithKline y está disponible comercialmente. Lapatinib inhibe la actividad de la tirosina quinasa asociada con dos oncogenes, EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y HER2/neu (EGFR humano tipo 2) ("A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells" *Cancer Res.* 2004 Sep 15; 64(18): 6652-9). Lapatinib inhibe los procesos de la señal del receptor uniéndose al bolsillo de unión al ATP del dominio de la proteína quinasa EGFR/HER2, evitando la autofosforilación y posterior activación del mecanismo de señal ("Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors". *Annals of Pharmacotherapy*: 40 (2); 261-269).

Erlotinib es un inhibidor de EGFR. El fármaco sigue a gefitinib (Iressa®), que fue el primer fármaco de este tipo. Gefitinib y erlotinib son los inhibidores de las tirosinas quinasas del receptor del factor de crecimiento epidérmico disponibles en el mercado (EGFR-TKIs) que se usan ampliamente para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Erlotinib se dirige específicamente a la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que está altamente expresada y ocasionalmente mutada en diversas formas de cáncer. Se une de forma reversible al sitio de unión al receptor de adenosina trifosfato (ATP) (*J Clin Oncol*, 2007; 25:1960-1966).

El cisplatino es un compuesto de platino que actúa como un agente anticanceroso citotóxico. Este fármaco de quimioterapia basado en el platino, mata las células cancerosas al dañar el ADN e inducir la apoptosis. El cisplatino está disponible comercialmente para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluidos los sarcomas, algunos carcinomas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de ovario), linfomas y tumores de células germinales. El cisplatino es un agente citotóxico no específico del ciclo celular que es eficaz contra las células que se dividen activamente y las que simplemente descansan antes de entrar en el ciclo celular y reacciona *in vivo*, uniéndose a y causando enlaces cruzados de ADN lo que finalmente desencadena la apoptosis (muerte celular programada).

El fluorouracilo (5-FU) es un antimetabolito y un agente citotóxico anticanceroso. 5-FU inhibe la síntesis de ADN y la muerte celular y penetra bien en el líquido cefalorraquídeo. El 5-FU está disponible comercialmente como un antimetabolito que interfiere con la síntesis de ARN y ADN. 5-FU es terapéuticamente útil para ciertos tipos de carcinoma, como el carcinoma de colon, recto, mama, estómago y páncreas.

El docetaxel es un agente antineoplásico que pertenece a la familia de los taxoides que actúa interrumpiendo la red microtubular en las células que es esencial para las funciones celulares mitóticas e interfásicas. El docetaxel se une a la tubulina libre y promueve el ensamblaje de tubulina en microtúbulos estables, al mismo tiempo que inhibe su desensamblaje. Esto conduce a la producción de haces de microtúbulos sin función normal y a la estabilización de los microtúbulos, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células. La unión del docetaxel a los

microtúbulos no altera el número de protofilamentos en los microtúbulos unidos, una característica que difiere de la mayoría de los venenos fusiformes actualmente en uso clínico. El docetaxel se comercializa en todo el mundo bajo el nombre de Taxotere® por Sanofi y está disponible comercialmente.

5 El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante dirigido contra el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) con actividad antineoplásica. Cetuximab se une al dominio extracelular del EGFR, impidiendo así la activación y posterior dimerización del receptor; la disminución en la activación y dimerización del receptor puede dar como resultado una inhibición en la transducción de la señal y efectos antiproliferativos. Este agente puede inhibir el crecimiento y la metástasis del tumor primario dependiente de EGFR. Cetuximab está disponible comercialmente como Erbitux® para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico y el cáncer de cabeza y cuello.

10 En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) en donde la combinación comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de Fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y sorafenib.

15 Otra forma de realización de la presente invención proporciona una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de Fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y lapatinib.

20 En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de Fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y erlotinib.

25 Otra forma de realización de la presente invención proporciona una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; cisplatino y 5-fluorouracilo o sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado entre los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto A y sorafenib o sus sales farmacéuticamente aceptables.

35 En otra forma de realización, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto A y lapatinib o sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto A y erlotinib o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto A, cisplatino y 5-fluorouracilo o sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 Una forma de realización adicional de la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto A, docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo o sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto B y sorafenib o sus sales farmacéuticamente aceptables.

50 En otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en donde la combinación comprende el compuesto B y lapatinib o sus sales farmacéuticamente aceptables.

Según otra forma de realización de la presente invención, la combinación farmacéutica que comprende el inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I y un agente antineoplásico seleccionado de sorafenib,

- 5 lapatinib y erlotinib o la combinación farmacéutica que comprende el inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I, y cisplatino y 5-fluorouracilo o la combinación farmacéutica que comprende el inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I, y cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, no se limita exclusivamente a aquellas combinaciones que se obtienen por asociación física de dichos ingredientes, sino que también abarca aquellas que permiten una administración separada, que puede ser simultánea, secuencial o espaciada durante un período de tiempo a fin de obtener la máxima eficacia de la combinación. Por lo tanto, la combinación farmacéutica puede administrarse simultáneamente o secuencialmente para un tratamiento eficaz del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- 10 Según otra forma de realización, la presente invención se dirige a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas que comprende radiación, un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib, y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 15 Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas que comprende radiación, un inhibidor de CDK seleccionado del compuesto A o compuesto B y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib, y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 20 Según otra forma de realización, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) en donde la combinación comprende radiación, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK) seleccionado del compuesto A o B o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y el anticuerpo monoclonal, cetuximab.
- 25 En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I (como se describe en el presente documento) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y una cantidad terapéuticamente eficaz de sorafenib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 En otra forma de realización adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y una cantidad terapéuticamente eficaz de lapatinib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 En otra forma de realización adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y una cantidad terapéuticamente eficaz de erlotinib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado entre los compuestos de fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, una cantidad terapéuticamente eficaz de cisplatino y una cantidad terapéuticamente eficaz de 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado del compuesto A o compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib, y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 En otra forma de realización adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A y una cantidad terapéuticamente eficaz de sorafenib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A y una cantidad terapéuticamente eficaz de lapatinib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de sorafenib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de lapatinib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A y una cantidad terapéuticamente eficaz de erlotinib en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los compuestos A, cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de los compuestos A, docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico seleccionado de sorafenib, lapatinib o erlotinib; en donde dicho inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran simultáneamente o secuencialmente.

25 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos; una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde dicho inhibidor de CDK, cisplatino y 5-fluorouracilo se administran simultánea o secuencialmente.

30 Un método para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado del compuesto A o compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico seleccionado de sorafenib, lapatinib o erlotinib; en donde dicho compuesto A o compuesto B y agente antineoplásico se administran simultánea o secuencialmente.

35 Un método para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado del compuesto A o compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de sorafenib; en donde dicho compuesto A o compuesto B y sorafenib se administran simultáneamente o secuencialmente.

40 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de CDK seleccionado del compuesto A o compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de lapatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde dicho compuesto A o compuesto B y lapatinib se administran simultáneamente o secuencialmente.

45 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de erlotinib; en donde dicho compuesto A y erlotinib se administran simultánea o secuencialmente.

50 Un método para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; una cantidad terapéuticamente eficaz de cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde dicho compuesto A, cisplatino y 5-fluorouracilo se administran simultánea o secuencialmente.

50 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula (I) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde dicho inhibidor de CDK y dicho agente antineoplásico o sus sales farmacéuticamente aceptables se administran secuencialmente.

- 5 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A o del compuesto B; una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico seleccionado de sorafenib, lapatinib o erlotinib; en donde dicho compuesto A o compuesto B y agente antineoplásico seleccionado de sorafenib, lapatinib o erlotinib se administran secuencialmente de manera que el compuesto A o el compuesto B se administra antes o después de la administración de sorafenib o lapatinib o erlotinib.
- 10 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A y una cantidad terapéuticamente eficaz de sorafenib; en donde dicho compuesto A y sorafenib se administran secuencialmente de manera que el compuesto A se administra antes o después de la administración de sorafenib.
- 15 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de sorafenib; en donde dicho compuesto B y sorafenib se administran secuencialmente de manera que el compuesto B se administra antes o después de la administración de sorafenib.
- 20 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A y una cantidad terapéuticamente eficaz de lapatinib; en donde dicho compuesto A y lapatinib se administran secuencialmente de manera que el compuesto A se administra antes o después de la administración de lapatinib.
- 25 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto B y una cantidad terapéuticamente eficaz de lapatinib; en donde dicho compuesto B y lapatinib se administran secuencialmente de manera que el compuesto B se administra antes o después de la administración de lapatinib.
- 30 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A; una cantidad terapéuticamente eficaz de erlotinib; en donde dicho compuesto A y erlotinib se administran secuencialmente de manera que el compuesto A se administra antes o después de la administración de erlotinib.
- 35 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A; una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de cisplatino; y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde dicho compuesto A, cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos se administran secuencialmente de manera que el compuesto A se administra antes o después de la administración de cisplatino y/o 5-fluorouracilo.
- 40 Un método para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A; una cantidad terapéuticamente eficaz de cada uno de docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en donde dicho compuesto A, docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos se administra secuencialmente de manera que el compuesto A se administra antes o después de la administración de docetaxel, y/o cisplatino y/o 5-fluorouracilo.
- 45 La administración de la combinación doble de inhibidor de CDK seleccionado del compuesto de fórmula I y un agente antineoplásico o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos seleccionados de sorafenib, lapatinib o erlotinib puede producir efectos, tales como efectos anticancerosos, mejores que los logrados con cualquiera de los inhibidores de CDK o sorafenib o lapatinib o erlotinib cuando se usan solos.
- 50 La administración de una combinación triple del inhibidor de CDK seleccionado del compuesto de fórmula I como se describe en el presente documento, cisplatino y 5-fluorouracilo puede producir efectos, tales como efectos anticancerosos, mejores que los logrados con cualquiera de los inhibidores de CDK o cisplatino o 5-fluorouracilo utilizado solos, mejores que los logrados con la combinación del inhibidor de CDK, cisplatino y 5-fluorouracilo.
- 55 La ruta de administración de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada. En una forma de realización, los ingredientes activos (los agentes anticancerosos contenidos en la combinación) comprendidos en la composición pueden tener que administrarse por diferentes rutas, ya sea por vía oral o parenteral, dependiendo de la forma de dosificación. La forma de dosificación adecuada para la administración oral puede ser un comprimido o cápsula, las formas de administración parenteral incluyen inyección intravenosa, infusión intravenosa, inyección subcutánea, inyección transdérmica, inyección intraperitoneal, etc. Para la administración rectal, por ejemplo como un supositorio la vía de administración puede ser por inyección directa en el tumor o por administración regional o por administración local. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen la lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar, y se añaden comúnmente agentes lubricantes tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los vehículos útiles incluyen la lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar. Para uso

intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, generalmente se emplean soluciones estériles del ingrediente activo, y el pH de las soluciones debe ajustarse y tamponarse adecuadamente.

5 En la práctica de la presente invención, los inhibidores de CDK seleccionados de los compuestos de fórmula I pueden administrarse tanto por vía oral como parenteral para generar y mantener buenos niveles sanguíneos de los mismos, mientras que uno o más agentes antineoplásicos pueden administrarse por vía oral o parenteral, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular o cualquier otra vía de administración adecuada.

En una forma de realización, los agentes terapéuticos (los inhibidores de CDK y los agentes antineoplásicos) contenidos en la combinación de la invención se formulan según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica.

10 En la práctica, las preparaciones orales para administración oral pueden producirse añadiendo a los ingredientes activos rellenos, y si es necesario, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, etc. y formulando la mezcla resultante según los procedimientos convencionales en comprimidos, comprimidos recubiertos, gránulos, gránulos sutiles, polvos, cápsulas o similares. Ejemplos del relleno incluyen, pero no se limitan a la lactosa, almidón de maíz, azúcar blanco, glucosa, sorbitol, celulosa cristalina, dióxido de silicio, etc.

15 Ejemplos de aglutinante incluyen pero no se limitan al alcohol polivinílico, etilcelulosa, metilcelulosa, goma arábica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etc. Ejemplos del lubricante incluyen, pero no se limitan al, estearato de magnesio, talco, sílice, etc. El agente colorante puede ser cualquier agente colorante que esté aprobado para ser añadido a preparaciones farmacéuticas. Los ejemplos del agente aromatizante incluyen, pero no se limitan al, cacao en polvo, mentol, polvo aromático, aceite de menta, alcanfor, polvo de canela, etc. Los comprimidos y gránulos resultantes pueden recubrirse apropiadamente con, por ejemplo, azúcar o gelatina según la necesidad. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía transdérmica en forma de parches, es preferible seleccionar la denominada forma libre que no forma una sal. Las preparaciones de inyección se pueden producir como preparaciones de infusión intravenosa o preparaciones de inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular según procedimientos convencionales. Ejemplos del agente de suspensión incluyen, pero no se limitan a la metilcelulosa, polisolvato 80, hidroxietilcelulosa, goma arábica, polvo de tragacanto, carboximetilcelulosa

20 sódica, polioxietileno sorbitán monolaurato, etc. Ejemplos del coadyuvante de la disolución incluyen, pero no se limitan al, polioxietileno aceite de ricino hidrogenado, Polisolvato 80, nicotinamida, polioxietileno sorbitán monolaurato, macrogol, éster etílico de ácido graso de aceite de ricino, etc. Ejemplos del estabilizante incluyen, pero no se limitan al sulfito sódico, metasulfito sódico, etc. Ejemplos del conservante incluyen el parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol, clorocresol etc.

25

30

Aunque las dosis eficaces de los agentes terapéuticos (los inhibidores de CDK y los agentes antineoplásicos o anticancerosos) para la administración varían dependiendo de la gravedad de los síntomas, edad, sexo, peso corporal y diferencia de sensibilidad del paciente, el modo, tiempo, intervalo y duración de administración, la naturaleza, formulación y tipo de preparación, el tipo de ingrediente activo, etc. en ciertas formas de realización, los agentes terapéuticos se administran en un marco temporal donde ambos agentes todavía estén activos. Un experto en la técnica podría determinar dicho marco temporal determinando la semivida de los agentes terapéuticos administrados. Como se indicó anteriormente en el presente documento, los ingredientes activos contenidos en la composición farmacéutica pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. Los expertos en la materia reconocerán que son posibles varias variaciones.

35

40 Para una administración eficaz, los agentes terapéuticos de la combinación farmacéutica de la presente invención se proporcionan en un intervalo de dosis particular, por ejemplo, el inhibidor de CDK seleccionado de compuesto de fórmula I tal como el compuesto A puede proporcionarse en un intervalo de dosis general de 75 mg/m<sup>2</sup>/día a 200 mg/m<sup>2</sup>/día; otro inhibidor de CDK seleccionado del compuesto de fórmula I tal como el Compuesto B puede proporcionarse en un intervalo de dosis general de 50 mg a 350 mg por vía oral. Además, entre los agentes antineoplásicos, se puede proporcionar el cisplatino en un intervalo de dosis de 40 mg/m<sup>2</sup>/día a 200 mg/m<sup>2</sup>/día, se puede proporcionar 5-fluouracilo en un intervalo de dosis de 40 mg/m<sup>2</sup>/día a 200 mg/m<sup>2</sup>/día, docetaxel puede administrarse en un intervalo de dosis general de 20 mg/m<sup>2</sup>/día a 75 mg/m<sup>2</sup>/día, se puede administrar sorafenib en al menos una cantidad de aproximadamente 200 mg a 400 mg (comprimidos de 2x200 mg) por vía oral bid, lapatinib puede administrarse en una dosis que varía de 500 a 1500 mg/día y erlotinib se puede proporcionar en un intervalo de dosis de aproximadamente 150 mg/día a 300 mg/día.

45

50

Las combinaciones proporcionadas por esta invención se han evaluado en ciertos sistemas de ensayo, los detalles experimentales se proporcionan en el presente documento a continuación.

La eficacia sinérgica de la combinación de la presente invención se demuestra llevando a cabo el estudio *in vitro* que implica el uso de una combinación, por ejemplo, un inhibidor de CDK de fórmula I como se describe en el presente documento como compuesto A o compuesto B y uno o más agentes antineoplásicos seleccionados. Está claramente indicado que cuando los agentes antineoplásicos se usan en combinación con inhibidores de CDK en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello la apoptosis en células proliferativas es mayor que cuando las células se tratan con el inhibidor de CDK de fórmula I solamente o el agente antineoplásico solo. Por ejemplo, se establece claramente a partir de los datos descritos en el presente documento que el inhibidor de CDK de fórmula I, compuesto descrito en el presente documento como compuesto A o compuesto B, en combinación con uno o más

55

60

agentes antineoplásicos como se describe en el presente documento, son sinérgicamente eficaces en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. El sinergismo exhibido por la combinación farmacéutica de la presente invención también se demuestra a través de los datos del estudio *in vivo* como se indica en el presente documento.

5 Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no a limitar, la presente invención.

### Ejemplos

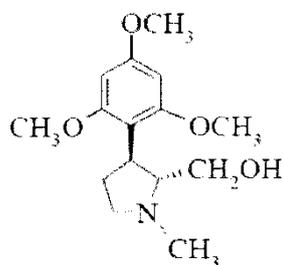
Ejemplo 1:

A) Procedimiento general para la preparación de los inhibidores de CDK (los compuestos de fórmula I):

10 Los compuestos de fórmula I se pueden preparar según los métodos descritos en la publicación de patente PCT documento de patente internacional N° WO2004004632 y la publicación de patente PCT documento de patente internacional N° WO2007148158.

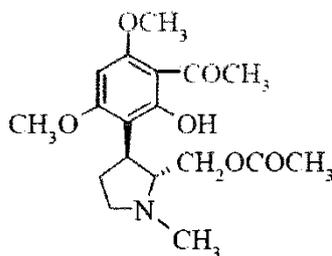
El procedimiento general para la preparación del compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprende los siguientes pasos:

a) tratar el enantiómero enantioméricamente puro (-)-*trans* resuelto del compuesto intermedio de fórmula VIA,



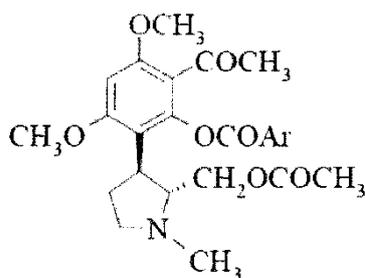
VIA

15 con anhídrido acético en presencia de un catalizador de ácido de Lewis para obtener un compuesto acetilado resuelto de fórmula VIIA,



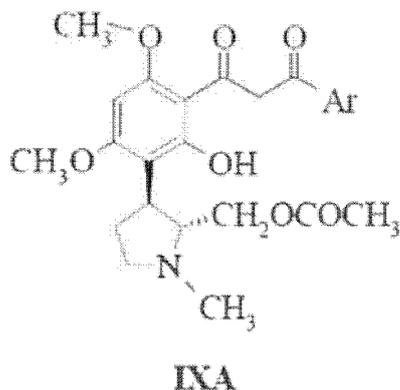
VIIA

20 b) hacer reaccionar el compuesto acetilado resuelto de fórmula VIIA con un ácido de fórmula ArCOOH o un cloruro de ácido de fórmula ArCOCl o un anhídrido de ácido de fórmula (ArCO)<sub>2</sub>O o un éster de fórmula ArCOOCH<sub>3</sub>, en donde Ar es como se define en el presente documento anteriormente en referencia al compuesto de fórmula I, en presencia de una base y un disolvente para obtener un compuesto resuelto de fórmula VIIIA;



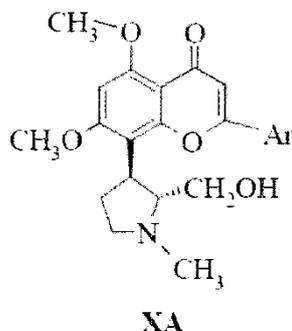
VIIIA

25 c) tratar el compuesto resuelto de fórmula VIIIA con una base en un disolvente adecuado para obtener el compuesto de β-dicetona resuelto correspondiente de fórmula IXA;



en donde Ar es como se definió anteriormente;

d) tratar el compuesto de  $\beta$ -dicetona resuelto de fórmula IXA con un ácido tal como ácido clorhídrico para obtener el correspondiente compuesto ciclado de fórmula XA,



5

e) someter el compuesto de fórmula XA a desalquilación calentándolo con un agente desalquilante a una temperatura que varía de 120-180° C para obtener el enantiómero (+)-*trans* del compuesto de fórmula I y, opcionalmente, convertir el compuesto sujeto en su sal farmacéuticamente aceptable.

10 El catalizador de ácido Lewis utilizado en la etapa (a) anterior puede ser seleccionado de: BF<sub>3</sub>, Et<sub>2</sub>O, cloruro de zinc, cloruro de aluminio y cloruro de titanio. La base utilizada en la etapa del proceso (b) se puede seleccionar de trietilamina, piridina y una combinación de DCC-DMAP (combinación de N,N'-diciclohexil carbodiimida y 4-dimetilaminopiridina).

15 Resultará evidente para los expertos en la técnica que la transposición del compuesto de fórmula VIII A al correspondiente compuesto de  $\beta$ -dicetona de fórmula IXA se conoce como una transposición de *Baker-Venkataraman* (J. Chem. Soc., 1381 (1933) y Curr. Sci., 4.214 (1933)).

20 La base utilizada en la etapa del proceso (c) se puede seleccionar de: hexametildisilazida de litio, hexametildisilazida de sodio, hexametildisilazida de potasio, hidruro de sodio e hidruro de potasio. Una base preferida es la hexametildisilazida de litio. El agente desalquilante usado en la etapa (e) del proceso para la desalquilación del compuesto de fórmula IXA se puede seleccionar entre: clorhidrato de piridina, tribromuro de boro, eterato de trifluoruro de boro y tricloruro de aluminio. Un agente desalquilante preferido es el clorhidrato de piridina.

25 La preparación del compuesto de partida de fórmula VIA implica la reacción de 1-metil-4-piperidona con una solución de 1,3,5-trimetoxibenceno en ácido acético glacial, para dar 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)-1,2,3,6-tetrahidropiridina, que se hace reaccionar con dietileterato de trifluoruro de boro, borohidruro de sodio y tetrahydrofurano para dar 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)piperidin-3-ol. La conversión de 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)piperidin-3-ol al compuesto de fórmula VIA implica la conversión del grupo hidroxil presente en el anillo de piperidina del compuesto, 1-metil-4-(2,4,6-trimetoxifenil)piperidin-3-ol a un grupo saliente tal como un tosilo, mesilo, triflato o haluro por tratamiento con un reactivo apropiado tal como cloruro de p-toluensulfonilo, cloruro de metansulfonilo, anhídrido tríflico o pentacloruro de fósforo en presencia de nucleófilos de oxígeno tales como trietilamina, piridina, carbonato de potasio o carbonato de sodio, seguido de contracción del anillo en presencia de nucleófilos de oxígeno tales como acetato de sodio o acetato de potasio en un disolvente alcohólico tal como isopropanol, etanol o propanol.

30

B) Preparación del clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (compuesto A)

5 Clorhidrato de piridina fundido (4,1 g, 35,6 mmoles) se añadió a (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-5,7-dimetoxi-cromen-4-ona (0,4 g, 0,9 mmoles) y se calentó a 180° C durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 25° C, se diluyó con MeOH (10 ml) y se basificó usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a pH 10. La mezcla se filtró y la capa orgánica se concentró. El residuo se suspendió en agua (5 ml), se agitó durante 30 minutos, se filtró y se secó para obtener el compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

Rendimiento: 0,25 g (70%); IR (KBr): 3422, 3135, 1664, 1623, 1559 cm<sup>-1</sup>;

1H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7,56 (d, 1H), 7,36 (m, 3H), 6,36 (s, 1H), 6,20 (s, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,70 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 2,88 (m, 1H), 2,58 (s, 3H), 2,35 (m, 1H), 1,88 (m, 1H); MS (ES<sup>+</sup>): m/z 402 (M+1);

10 Análisis: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>5</sub>, 62,24 (62,71); H, 5,07 (4,97); N, 3,60 (3,48); Cl, 9,01 (8,83).

El compuesto como se obtuvo anteriormente (0,2 g, 0,48 mmoles) se suspendió en IPA (5 ml) y se añadió HCl al 3,5% (25 ml). La suspensión se calentó para obtener una solución clara. La solución se enfrió y se filtró en un sólido para obtener el compuesto, clorhidrato de (+)-trans-2-(2-clorofenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

15 Rendimiento: 0,21 g (97%); pf: 188 - 192° C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +21,3° (c = 0,2, metanol);

1H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz): δ 7,80 (d, 1H), 7,60 (m, 3H), 6,53 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,89 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,38 (m, 1H), 2,90 (s, 3H), 2,45 (m, 1H), 2,35 (m, 1H); MS (ES<sup>+</sup>): m/z 402 (M + 1) (base libre).

20 Este compuesto se sometió a HPLC quiral. La HPLC quiral se realizó usando la columna Chiralcel OD-H (250 x 4,6 mm) y el sistema disolvente de hexano:etanol (92:08) con TFA (0,4%). Los resultados se registran a 264 nm con un caudal de disolvente de 1 ml/min. Como se representa la HPLC quiral mostró 100% de exceso enantiomérico del compuesto, clorhidrato de (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

25 C) Preparación del clorhidrato de (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona

(Compuesto B)

30 Una mezcla del compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-8-(2-hidroximetil-1-metilpirrolidin-3-il)-5,7-dimetoxi-cromen-4-ona (0,25 g, 0,5 mmoles), clorhidrato de piridina (0,25 g, 2,16 mmoles) y una cantidad catalítica de quinolina se calentó a 180° C durante un período de 2,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con metanol (25 ml) y se basificó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sólido a pH 10. La mezcla de reacción se filtró, y se lavó con metanol. La capa orgánica se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna usando 0,1% de amoníaco y 4,5% de metanol en cloroformo como eluyente para dar el compuesto, (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metilpirrolidin-3-il)-cromen-4-ona, como un sólido amarillo.

Rendimiento: 0,15 g (63,7%);

35 1H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7,99 (m, 2H), 7,83 (d, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,41 (s, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,41 (m, 1H), 2,99 (s, 3H), 2,54 (m, 1H), 2,28 (m, 1H); MS (ES<sup>+</sup>): m/z 470 (M+1).

El compuesto (0,1 g, 0,2 mmoles) como se obtuvo anteriormente se suspendió en metanol (2 ml) y se trató con HCl etéreo y el disolvente orgánico se evaporó para producir el compuesto, clorhidrato de (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona.

40 Rendimiento: 0,1 g (92,8%);

1H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 8,02 (d, 2H), 7,83 (d, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,41 (s, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,68 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,39 (m, 1H), 2,99 (s, 3H), 2,54 (m, 1H), 2,31 (m, 1H).

Estudios *in vitro* que involucran el uso de la combinación constituida por un inhibidor de CDK y uno o más agentes antineoplásicos

45 Los estudios *in vitro* que implican el uso de una combinación que comprende un inhibidor de CDK seleccionado de (+)-trans-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona clorhidrato (compuesto A) y (+)-trans-2-(2-cloro-4-trifluorometilfenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona clorhidrato (compuesto B) y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, que exhiben el efecto sinérgico de la combinación de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

50 de la combinación de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2:

## Materiales:

Sorafenib, lapatinib y erlotinib se obtuvieron de LC Labs (Estados Unidos). Cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel se obtuvieron de Sigma. El kit de citotoxicidad CK-8 se adquirió en Dojindo Molecular Technologies, Japón. Los medios de cultivo y el suero bovino fetal (FBS) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Missouri) y Gibco (Paisley, Escocia), respectivamente. Las células cancerosas de cabeza y cuello SCC-25, Detroit 562 y FADU se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia). Las células se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal, solución de penicilina-estreptomicina estabilizada, filtrado en condiciones estériles, con 100 unidades de penicilina/ml y 100 mg de estreptomicina/ml. Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y se guardaron en una incubadora en una atmósfera humidificada (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>). Las células se pasaron al alcanzar el 80% de confluencia.

## Ensayo de proliferación celular:

Células en crecimiento logarítmico se sembraron a una densidad de 3 x 10<sup>3</sup> células/pocillo y se dejaron recuperar durante la noche. Las células se expusieron a concentraciones variables de diferentes agentes anticancerosos (compuesto A, compuesto B, sorafenib, lapatinib, erlotinib, cisplatino, docetaxel y 5-fluorouracilo) y las células de control recibieron medios estándar que contenían el vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 0,2%. Después de 72 horas, la toxicidad celular se determinó mediante el reactivo CCK-8 (Cell Counting Kit-8) (Dojindo Molecular Technologies, Japón); ensayo WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio, sal monosódica). Según las instrucciones del fabricante, se añadieron 5 µl/pocillo de reactivo CCK-8 y las placas se incubaron durante 2 horas. La toxicidad se determinó midiendo la absorbancia en el lector de microplacas de fluorescencia múltiple de Tecan Sapphire (Tecan, Alemania, GmbH) a una longitud de onda de 450 nm corregida a 650 nm y normalizada a los controles. Se llevó a cabo un ensayo colorimétrico no radiactivo CCK-8 para caracterizar el crecimiento *in vitro* de SCC-25, Detroit 562 y FADU, así como para probar la actividad antiproliferativa/citotóxica de los agentes anticancerosos, compuesto A, compuesto B, sorafenib, lapatinib, erlotinib, cisplatino, docetaxel y 5-fluorouracilo cuando se usaron en combinación. CCK-8 permite ensayos convenientes usando la sal de tetrazolio de Dojindo, WST [8[(2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio, sal monosódica)], que produce un colorante formazano soluble en agua tras la reducción biológica en presencia de un transportador de electrones, 1-metoxi PMS. La solución CCK-8 se agrega directamente a las células, no se requiere mezclar previamente los componentes. CCK-8 es un ensayo colorimétrico no radiactivo sensible para determinar el número de células viables en los ensayos de proliferación celular y ensayos de citotoxicidad. WST-8 es reducido biológicamente por deshidrogenasas celulares a un producto naranja formazano que es soluble en el medio de cultivo de tejidos. La cantidad de formazano producida es directamente proporcional al número de células vivas. La sensibilidad de la detección de los ensayos de proliferación celular con WST-8 es mayor que con otras sales de tetrazolio como MTT, XTT, MTS o WST-1. La densidad óptica (DO) se determinó a una longitud de onda de medición de 450 nm y longitud de onda de referencia de 630 nm.

Determinación de las concentraciones inhibitorias 50 por ciento (CI<sub>50</sub>) del compuesto A, compuesto B, sorafenib, lapatinib, erlotinib, docetaxel, cisplatino y 5-FU.

Con el fin de determinar la CI<sub>50</sub> del compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib, en células FADU SCC-25, Detroit 562 y la CI<sub>50</sub> de los compuestos erlotinib, docetaxel, cisplatino y 5-FU en células Detroit 562 y FADU, las células se trataron con los agentes anticancerosos especificados ("los compuestos de prueba") a las concentraciones mencionadas a continuación. Todos los agentes anticancerosos se analizaron en las siguientes dosis de concentración final 0,03 µM, 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM y 100 µM en cuanto a su capacidad para exhibir citotoxicidad, particularmente para exhibir un 50% de citotoxicidad. Las células se sembraron a una densidad de 3000 células/pocillo, en 200 µl en placas de 96 pocillos de grado de cultivo tisular y se dejaron recuperar durante 24 horas en una incubadora humidificada al 5% ± 0,2 CO<sub>2</sub> a 37 ± 0,5° C. Después de 24 horas, 1 µl de 200 X (200 veces más que la concentración requerida se indica como 200 X) del compuesto de prueba (compuesto A, compuesto B lapatinib, sorafenib, erlotinib, docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo) se añadió disuelto en dimetilsulfóxido puro (DMSO) a las celdas. La concentración final de DMSO fue del 0,5% en los pocillos. Las placas se incubaron durante 48 horas en una incubadora humidificada 5% ± 0,2 CO<sub>2</sub> a 37 ± 0,5° C. Después de 48 horas, las placas se retiraron de la incubadora de CO<sub>2</sub> y se añadió 5 µl del Kit de recuento de células (CCK-8) por pocillo. La misma placa se mantuvo a 37° C durante 3 horas y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. La absorbancia a una longitud de onda de 450 nm se leyó en el lector Tecan safire. El porcentaje de citotoxicidad se calculó usando la siguiente fórmula.

Porcentaje de citotoxicidad = (DO del control-DO células tratadas X 100) / DO del control de DMSO

Estudios de dosis/respuesta a las 72 horas en células SCC-25 mostraron que el compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 0,4 µM, 1,1 µM, 2,7 µM y 0,5 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 1 y se presentan gráficamente en la figura 1a y 1b.

Estudios de dosis/respuesta a las 72 horas en células Detroit-562 mostraron que el compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 1,3 µM, 14,1 µM, 6,1 µM y 3,9 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y se presentan gráficamente en la figura 2a y 2b.

Estudios de dosis respuesta a las 72 horas en células FADU mostraron que el compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 1,3 µM, 4,1 µM, 8,4 µM y 2,6 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 3 y se presentan gráficamente en la figura 3a y 3b.

5 Estudios de dosis-respuesta a las 72 horas en células Detroit-562 mostraron que el compuesto A y erlotinib inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 1,3 µM, y 2,3 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 4 y se presentan gráficamente en la figura 4a.

Estudios de dosis-respuesta a las 72 horas en células FADU mostraron que el compuesto A y erlotinib inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 1,3 µM, y 10,2 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 5 y se presentan gráficamente en la figura 4b.

10 Estudios de dosis-respuesta a las 72 horas en células Detroit-562 mostraron que el cisplatino, el compuesto A y 5-FU inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 14,6 µM, 1,3 µM, y 6,3 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 6 y se representan gráficamente en la figura 5a.

15 Estudios de dosis-respuesta a las 72 horas en células FADU mostraron que el cisplatino, el compuesto A y 5-FU inhibieron el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 8,3 µM, 1,3 µM, y 11,6 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 7 y se representan gráficamente en la figura 5b.

Estudios de dosis-respuesta a las 72 horas en células Detroit-562 mostraron que docetaxel, cisplatino, el compuesto A y 5-FU inhibieron el crecimiento del 10% (CI<sub>10</sub>) a 0,009 µM, 0,3 µM, 0,1 µM y 0,31 µM y el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 0,85 µM, 14,6 µM, 1,3 µM y 6,3 µM respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 6 y se representan gráficamente en la figura 5a.

20 Los estudios de dosis-respuesta a las 72 horas en células FADU mostraron que docetaxel, cisplatino, el compuesto A y 5-FU inhibieron el crecimiento del 10% (CI<sub>10</sub>) a 0,003 µM, 0,25 µM, 0,08 µM y 0,31 µM y el crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) a 0,16 µM, 8,3 µM, 1,3 µM y 11,6 µM, respectivamente. Los resultados se presentan en la Tabla 7 y se representa gráficamente en la figura 5b.

25 Del mismo modo se establecieron las concentraciones CI<sub>30</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub> para todos los compuestos probados (compuestos anticancerosos) a partir de las dosis a las que un compuesto particular muestra 30%, 70% y 90% de actividad respectivamente en el ensayo de citotoxicidad.

Tabla 1 Concentraciones inhibitorias del 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub>) del compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib en células SCC-25.

Agente anticanceroso	Células SCC-25 (concentración inhibitoria en µM)			
	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Compuesto A	0,1	0,4	4,1	33,3
Compuesto B	0,2	1,1	4,8	41,8
Sorafenib	0,18	2,7	6,8	11,7
Lapatinib	0,2	0,5	3,3	9,9

30

Tabla 2 Concentraciones inhibitorias del 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub>) del compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib en células Detroit-562.

Agente anticanceroso	Células Detroit-562 (concentración inhibitoria en µM)			
	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Compuesto A	0,5	1,3	12,1	26,3
Compuesto B	2,7	14,1	25,2	44,6
Sorafenib	1,8	6,1	11,2	15,3
Lapatinib	1,0	3,9	7,6	12,6

Tabla 3 Concentraciones inhibitorias del 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub>) del compuesto A, compuesto B, sorafenib y lapatinib en células FADU.

Agente anticanceroso	Células FADU (concentración inhibitoria en µM)			
	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Compuesto A	0,2	1,3	8,3	28,3
Compuesto B	2,3	4,1	9,6	31,4
Sorafenib	3,9	8,4	14,8	30,6
Lapatinib	0,8	2,6	8,7	14,3

5 Tabla 4 Concentraciones inhibitorias del 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> e CI<sub>90</sub>) del compuesto A y erlotinib.

Agente anticanceroso	Células Detroit-562 (concentración inhibitoria en µM)			
	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Compuesto A	0,5	1,3	12,1	26,3
Erlotinib	1,4	2,3	6,3	10,7

Tabla 5 Concentraciones inhibitorias del 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub>) del compuesto A, y erlotinib en células FADU.

Agente anticanceroso	Células FADU (Concentración inhibitoria en µM)			
	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Compuesto A	0,2	1,3	8,3	28,3
Erlotinib	0,9	10,2	30,7	63

10 Tabla 6 Concentraciones inhibitorias del 10%, 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>10</sub>, CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub>) de cisplatino, compuesto A, 5FU y docetaxel en células Detroit-562.

Agente anticanceroso	Células Detroit-562 (Concentración inhibitoria en µM)				
	CI <sub>10</sub>	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Cisplatino	0,3	3	14,6		74,5
Compuesto A	0,1	0,5	1,3		26,3
5-FU	0,31	1,1	6,3	17,6	33,4
Docetaxel	0,009	0,3	0,85	8,7	21,8

15 Tabla 7 Concentraciones inhibitorias del 10%, 30%, 50%, 70% y 90% (CI<sub>10</sub>, CI<sub>30</sub>, CI<sub>50</sub>, CI<sub>70</sub> y CI<sub>90</sub>) de cisplatino, compuesto A, 5-FU y docetaxel en células FADU

Agente anticanceroso	Células FADU (Concentración inhibitoria en µM)				
	CI <sub>10</sub>	CI <sub>30</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>70</sub>	CI <sub>90</sub>
Cisplatino	0,25	3	8,3	30	74
Compuesto A	0,08	0,2	1,3	8,3	28,3
5-FU	0,31	2,3	11,6	22,4	38,3
Docetaxel	0,003	0,06	0,16	0,71	35,6

Ejemplo 3

Estudios de combinación del compuesto A y sorafenib en células SCC-25, Detroit-562 y FADU.

A) células SCC-25

- 5 Sorafenib en la siguiente dosis de concentración final 0,18  $\mu\text{M}$  y el compuesto A en las siguientes dosis de concentración final 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$  y 4,1  $\mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos agentes anticancerosos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células SCC-25 se trataron con sorafenib durante 0 a 24 horas. Al cabo de 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico (medio esencial mínimo). Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200  $\mu\text{l}$ /pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 8 y se presentan gráficamente en la figura 6a.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células SCC-25) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$	13	-
2	Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	13	-
3	Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	24	-
4	Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	29	-
5	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	77	0,31
6	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	85	0,35
7	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	88	0,41

B) Células Detroit-562.

- 15 Sorafenib en la siguiente dosis de concentración final 1,8  $\mu\text{M}$  y el compuesto A en las siguientes dosis de concentración final 0,5  $\mu\text{M}$ , 1,3  $\mu\text{M}$  y 12,1  $\mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos agentes anticancerosos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células Detroit-562 se trataron con sorafenib de 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200  $\mu\text{l}$ /pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 9 y se presentan gráficamente en la figura 7a.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit-562) (Concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$	14	-
2	Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	15	-
3	Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	25	-
4	Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	30	-
5	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	78	0,35
6	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	84	0,37
7	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	86	0,39

25 C) células FADU

Sorafenib en la siguiente dosis de concentración final 3,9  $\mu\text{M}$  y el compuesto A en las siguientes dosis de concentración final 0,2  $\mu\text{M}$ , 1,3  $\mu\text{M}$  y 8,3  $\mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos agentes anticancerosos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células FADU se trataron con sorafenib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se

lavarón dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200 µl/pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 10 y se presentan gráficamente en la figura 8a.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Fadu) (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Sorafenib Cl <sub>30</sub>	21	-
2	Compuesto A Cl <sub>30</sub>	12	-
3	Compuesto A Cl <sub>50</sub>	18	-
4	Compuesto A Cl <sub>70</sub>	26	-
5	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>30</sub>	64	0,56
6	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>50</sub>	86	0,61
7	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>70</sub>	92	0,63

5 Ejemplo 4

Estudios de combinación del compuesto B y sorafenib en células SCC-25, Detroit-562 y FADU.

A) células SCC-25

10 Sorafenib en la siguiente dosis de concentración final 0,18 µM y el compuesto B en las siguientes dosis de concentración final 0,2 µM, 1,1 µM y 4,8 µM se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos agentes anticancerosos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células SCC-25 se trataron con sorafenib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200 µl/pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto B de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 11 y se presentan gráficamente en la figura 6b.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células SCC-25) (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Sorafenib Cl <sub>30</sub>	13	-
2	Compuesto B Cl <sub>30</sub>	16	-
3	Compuesto B Cl <sub>50</sub>	19	-
4	Compuesto B Cl <sub>70</sub>	26	-
5	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto B Cl <sub>30</sub>	48	0,68
6	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto B Cl <sub>50</sub>	51	0,73
7	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto B Cl <sub>70</sub>	56	0,81

15 B) Células Detroit-562

20 Sorafenib en la siguiente dosis de concentración final 1,8 µM y el compuesto B en las siguientes dosis de concentración final 2,7 µM, 14,1 µM y 25,2 µM se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos agentes anticancerosos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células Detroit-562 se trataron con sorafenib de 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200 µl/pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto B de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 12 y se presentan gráficamente en la figura 7b.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (Concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Sorafenib Cl <sub>30</sub>	13	-
2	Compuesto B Cl <sub>30</sub>	15	-
3	Compuesto B Cl <sub>50</sub>	19	-
4	Compuesto B Cl <sub>70</sub>	26	-
5	Sorafenib Cl <sub>30</sub> + Compuesto B Cl <sub>30</sub>	65	0,67

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (Concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
6	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	74	0,73
7	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	86	0,76

## C) Células FADU

5 Sorafenib en la siguiente dosis de concentración final  $3,9 \mu\text{M}$  y el compuesto B en las siguientes dosis de concentración final  $2,3 \mu\text{M}$ ,  $4,1 \mu\text{M}$  y  $9,6 \mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos fármacos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células FADU se trataron con sorafenib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% ( $200 \mu\text{l/pocillo}$ ), seguido de tratamiento con el compuesto B de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 13 y se presentan gráficamente en la figura 8b.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células FADU) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$	21	-
2	Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	14	-
3	Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	20	-
4	Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	27	-
5	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	59	0,74
6	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	77	0,81
7	Sorafenib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	88	0,84

10

## Ejemplo 5

Estudios de combinación del compuesto A y lapatinib en células SCC-25, Detroit-562 y FADU.

## A) Células cancerosas SCC-25

15 Lapatinib en la siguiente dosis de concentración final de  $0,2 \mu\text{M}$  y el compuesto A en las siguientes dosis de concentración final de  $0,2 \mu\text{M}$ ,  $0,5 \mu\text{M}$  y  $3,3 \mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos fármacos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células SCC-25 se trataron con lapatinib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% ( $200 \mu\text{l/pocillo}$ ), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 14 y se presentan gráficamente en la figura 9a.

20

Nº de serie	Agente anticanceroso (células SCC-25) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$	17	-
2	Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	12	-
3	Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	23	-
4	Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	26	-
5	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	69	0,68
6	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	83	0,71
7	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	89	0,75

## B) Células cancerosas Detroit-562

25 Lapatinib en la siguiente dosis de concentración final  $1 \mu\text{M}$  y el compuesto A en las siguientes dosis de concentración final de  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $1,3 \mu\text{M}$  y  $12,1 \mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles

del intervalo de dosis para los dos agentes anticancerosos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células Detroit-562 se trataron con lapatinib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200 µl/pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 15 y se presentan gráficamente en la figura 10a.

5

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562 (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Lapatinib Cl <sub>30</sub>	16	-
2	Compuesto A Cl <sub>30</sub>	11	-
3	Compuesto A Cl <sub>50</sub>	22	-
4	Compuesto A Cl <sub>70</sub>	25	-
5	Lapatinib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>30</sub>	68	0,81
6	Lapatinib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>50</sub>	82	0,88
7	Lapatinib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>70</sub>	88	0,71

### C) células cancerosas FADU

Lapatinib en la siguiente dosis de concentración final de 0,8 µM y compuesto A en las siguientes dosis de concentración final 0,2 µM, 1,3 µM y 8,3 µM se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos fármacos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células FADU se trataron con lapatinib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200 µl/pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 16 y se presentan gráficamente en la figura 11a.

10

15

Nº de serie	Agente anticanceroso (células FADU (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Lapatinib Cl <sub>30</sub>	19	-
2	Compuesto A Cl <sub>30</sub>	13	-
3	Compuesto A Cl <sub>50</sub>	22	-
4	Compuesto A Cl <sub>70</sub>	24	-
5	Lapatinib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>30</sub>	62	0,64
6	Lapatinib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>50</sub>	85	0,69
7	Lapatinib Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>70</sub>	89	0,83

### Ejemplo 6

Estudios de combinación del compuesto B y lapatinib en células SCC-25, Detroit-562 y FADU.

#### A) Células cancerosas SCC-25

20

Lapatinib en la siguiente dosis de concentración final de 0,2 µM y el compuesto B en las siguientes dosis de concentración final de 0,2 µM, 1,1 µM y 4,8 µM se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos fármacos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células SCC-25 se trataron con lapatinib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% (200 µl/pocillo), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 17 y se presentan gráficamente en la figura 9 b.

25

Nº de serie	Agente anticanceroso (células SCC-25) (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Lapatinib Cl <sub>30</sub>	17	-
2	Compuesto B Cl <sub>30</sub>	16	-

Nº de serie	Agente anticanceroso (células SCC-25) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
3	Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	19	-
4	Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	31	-
5	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	62	0,61
6	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	73	0,81
7	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	77	0,84

## B) Células cancerosas Detroit-562

5 Lapatinib en la siguiente dosis de concentración final de  $1,0 \mu\text{M}$  y el compuesto B en las siguientes dosis de concentración final de  $2,7 \mu\text{M}$ ,  $14,1 \mu\text{M}$  y  $25,2 \mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos fármacos mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células Detroit-562 se trataron con lapatinib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% ( $200 \mu\text{l/pocillo}$ ), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 18 y se presentan gráficamente en la figura 10b.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$	16	-
2	Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	15	-
3	Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	18	-
4	Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	30	-
5	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	70	0,71
6	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	87	0,65
7	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	90	0,77

## C) células cancerosas FADU

15 Lapatinib en la siguiente dosis de concentración final de  $0,8 \mu\text{M}$  y el compuesto B en las siguientes dosis de concentración final de  $2,3 \mu\text{M}$ ,  $4,1 \mu\text{M}$  y  $9,6 \mu\text{M}$  se analizaron en dosis única y en todas las combinaciones posibles del intervalo de dosis para los dos agentes anticanceroso mencionados anteriormente. La secuencia de tratamiento es la siguiente; las células FADU se trataron con lapatinib durante 0 a 24 horas. Al final de las 24 horas, las células se lavaron dos veces con medio MEM básico. Se añadió MEM nuevo con suero al 10% ( $200 \mu\text{l/pocillo}$ ), seguido de tratamiento con el compuesto A de 24 horas a 96 horas. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 19 y se presentan gráficamente en la figura 11b.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células FADU) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$	19	-
2	Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	21	-
3	Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	26	-
4	Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	33	-
5	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{30}$	74	0,78
6	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{50}$	89	0,91
7	Lapatinib $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto B $\text{Cl}_{70}$	93	0,71

## Ejemplo 7

Estudios de combinación del compuesto A y erlotinib en concentración de  $\text{Cl}_{30}$  en células Detroit-562

La combinación de erlotinib y el compuesto A resultó ser sinérgica a la  $CI_{30}$  de ambos agentes anticancerosos. Erlotinib a  $CI_{30}$  mostró citotoxicidad de 20,3% y el Compuesto A a  $CI_{30}$  mostró citotoxicidad de 8,30%. Sin embargo, cuando se usaron como una combinación de erlotinib  $CI_{30}$  durante 24 horas, seguido por el compuesto A a  $CI_{30}$  durante 48 horas, se observó un aumento en la citotoxicidad hasta el 60%, que es un 32% más de citotoxicidad que el efecto aditivo lo que sugiere un efecto sinérgico entre los dos agentes anticancerosos en las células Detroit-562 con un índice de combinación de 0,35. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 20 y se presentan gráficamente en la figura 12a.

5

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (concentración inhibitoria en $\mu M$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	erlotinib $CI_{30}$	20,3	-
2	Erlotinib $CI_{50}$	34,4	-
3	Erlotinib $CI_{70}$	40,0	-
4	Compuesto A $CI_{30}$	8,30	-
5	Compuesto A $CI_{50}$	33,80	-
6	Compuesto A $CI_{70}$	34,32	-
7	Erlotinib $CI_{30}$ + Compuesto A $CI_{30}$	60,64	0,35
8	Erlotinib $CI_{30}$ + Compuesto A $CI_{50}$	77,17	0,36
9	Erlotinib $CI_{30}$ + Compuesto A $CI_{70}$	76,89	0,89

Ejemplo 8

10 Estudios de combinación del compuesto A y erlotinib en células FADU

La combinación de erlotinib y el compuesto A resultó ser sinérgica a la  $CI_{30}$  de ambos agentes anticancerosos. Erlotinib a la  $CI_{30}$  mostró citotoxicidad de 16% y el compuesto A a la  $CI_{30}$  mostró citotoxicidad de 12,3%. Sin embargo, cuando se usaron como una combinación de erlotinib a concentración  $CI_{30}$  durante 24 horas, seguido por el compuesto A concentración  $CI_{30}$  durante 48 horas se mostró un aumento de citotoxicidad en la medida del 77%, que es 49% más de citotoxicidad que el efecto aditivo lo que sugiere un efecto sinérgico entre los dos fármacos en las células FADU con un índice de combinación de 0,23. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 21 y se presentan gráficamente en la figura 12b.

15

Nº de serie	Agente anticanceroso (células FADU) (concentración inhibitoria en $\mu M$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Erlotinib $CI_{30}$	16,24	-
2	Erlotinib $CI_{50}$	35,64	-
3	Erlotinib $CI_{70}$	41,1	-
4	Compuesto A $CI_{30}$	12,3	-
5	Compuesto A $CI_{50}$	26,54	-
6	Compuesto A $CI_{70}$	31,78	-
7	Erlotinib $CI_{30}$ + Compuesto A $CI_{30}$	77,191	0,23
8	Erlotinib $CI_{30}$ + Compuesto A $CI_{50}$	80,286	0,31
9	Erlotinib $CI_{30}$ + Compuesto A $CI_{70}$	84,134	0,67

Estudios *Vitro* que implican el uso de una combinación triple que consta del compuesto A, cisplatino y 5-FU

20 Ejemplo 9

Estudios de combinación del compuesto A, cisplatino y 5-FU a la  $CI_{30}$  en células Detroit-562.

La combinación del compuesto A y (cisplatino y 5-FU) resultó ser sinérgica a la  $CI_{30}$  de cada agente anticanceroso. El compuesto A a  $CI_{30}$  mostró citotoxicidad de 10,4% y (cisplatino y 5-FU) a  $CI_{30}$  mostraron citotoxicidad de 28,60%. Sin embargo, cuando se usaron como una combinación de (cisplatino y 5-FU)  $CI_{30}$  durante 24 horas, seguido del compuesto A a  $CI_{30}$  durante 48 horas, se observó un aumento en la citotoxicidad de hasta el 71%, lo que fue un 33% más citotóxico que el efecto aditivo lo que sugiere un efecto sinérgico entre los tres agentes anticancerosos en las

25

células Detroit-562 con un índice de combinación de 0,39. Mientras que la combinación doble de cisplatino y 5-FU mostró un índice de combinación de 0,9. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 22 y se presentan gráficamente en la figura 13a.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Cisplatino Cl <sub>30</sub>	4,07	-
2	Cisplatino Cl <sub>50</sub>	14,3	-
3	Cisplatino Cl <sub>70</sub>	16,2	-
4	5-FU Cl <sub>90</sub>	12,59	-
5	5-FU Cl <sub>50</sub>	16,21	-
6	5-FU Cl <sub>70</sub>	19,54	-
7	Compuesto A Cl <sub>30</sub>	10,42	-
8	Compuesto A Cl <sub>50</sub>	12,59	-
9	Compuesto A Cl <sub>70</sub>	18,02	-
10	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>30</sub>	28,67	0,9
11	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>50</sub>	32,86	1,21
12	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>70</sub>	26,38	1,45
13	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>30</sub>	68,38	0,22
14	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>50</sub> + Compuesto A Cl <sub>30</sub>	81,68	0,31
15	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>70</sub> + Compuesto A Cl <sub>30</sub>	75,22	0,39
16	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>50</sub>	77,30	0,56
17	Cisplatino Cl <sub>30</sub> + 5-FU Cl <sub>30</sub> + Compuesto A Cl <sub>70</sub>	75,75	0,64

5 Ejemplo 10

Estudios de combinación del compuesto A, cisplatino y 5-FU a la Cl<sub>30</sub> en células FADU.

Se descubrió que la combinación del compuesto A y (cisplatino y 5-FU) era sinérgica a la Cl<sub>30</sub> de cada agente anticanceroso. El compuesto A a la Cl<sub>30</sub> mostró citotoxicidad de 6,1% y (cisplatino y 5-FU) a la Cl<sub>30</sub> mostró citotoxicidad de 30,1%. Sin embargo, cuando se usaron como una combinación de (cisplatino y 5-FU) a una concentración de Cl<sub>30</sub> durante 24 horas, seguido por el compuesto A a Cl<sub>30</sub> durante 48 horas, se observó un aumento en la citotoxicidad de hasta el 81%, lo que fue un 44% más de citotoxicidad que el efecto aditivo lo que sugiere un efecto sinérgico entre los tres fármacos en células FADU con un índice de combinación de 0,23. Mientras que la combinación doble de cisplatino y 5-FU mostró un índice de combinación de 0,89. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 23 y se presentan gráficamente en la figura 13b.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células FADU) (concentración inhibitoria en µM)	Citotoxicidad %	Índice de combinación
1	Cisplatino Cl <sub>30</sub>	6,2	-
2	Cisplatino Cl <sub>50</sub>	11,1	-
3	Cisplatino Cl <sub>70</sub>	17,1	-
4	5-FU Cl <sub>30</sub>	17,81	-
5	5-FU Cl <sub>50</sub>	21,1	-
6	5-FU Cl <sub>70</sub>	28,6	-

Nº de serie	Agente anticanceroso (células FADU) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación
7	Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	6,1	-
8	Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	21,4	-
9	Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	27,8	-
10	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{30}$	30,8	0,89
11	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{50}$	34,53	1,15
12	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{70}$	42,82	1,31
13	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	67,73	0,56
14	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{50}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	72,43	0,67
15	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{70}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	72,94	0,78
18	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	82,40	0,31
19	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5-FU $\text{Cl}_{30}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{70}$	83,13	0,41

## Ejemplo 11

Estudios de combinación del compuesto A, cisplatino y 5-FU con docetaxel a la concentración de  $\text{Cl}_{30}$  en células Detroit-562.

- 5 La combinación del compuesto A y (cisplatino y 5-FU) con docetaxel resultó ser sinérgica a la  $\text{Cl}_{30}$  de cada agente anticanceroso. El compuesto A y el docetaxel a la  $\text{Cl}_{30}$  mostraron una citotoxicidad del 16,8% y 18,30 respectivamente (cisplatino y 5-FU) a la  $\text{Cl}_{30}$ , mostraron una citotoxicidad del 31,3%. Sin embargo, cuando se usaron como combinación de docetaxel a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$  durante 12 horas seguido de (cisplatino y 5-FU) a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$  durante 12 horas, seguido del compuesto A a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$  durante 48 horas, se observó un aumento de la citotoxicidad en la medida de 96,38%, con un índice de combinación de 0,29. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 24 y se presentan gráficamente en la figura 14a.

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación (valores C.I.)
1	Docetaxel $\text{Cl}_{10}$	11,75	-
2	Docetaxel $\text{Cl}_{30}$	18,30	-
3	Cisplatino $\text{Cl}_{10}$	6,92	-
4	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$	13,39	-
5	5-FU $\text{Cl}_{10}$	9,49	-
6	5-FU $\text{Cl}_{30}$	15,39	-
7	Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	16,81	-
8	Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	21,98	-
9	Cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$	33,09	0,91
10	Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$	31,92	1,1
11	Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ )	56,85	0,85

Nº de serie	Agente anticanceroso (células Detroit 562) (concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación (valores C.I.)
12	Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ )	61,77	0,93
13	Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ )	66,59	0,87
14	Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ )	71,81	0,81
15	Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	81,42	0,67
18	Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (Cisplatin $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	89,46	0,62
19	Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	91,47	0,37
20	Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	96,38	0,29

Ejemplo 12

Estudios de combinación del compuesto A, cisplatino y 5-FU con docetaxel en la concentración de  $\text{Cl}_{30}$  en células FADU.

- 5 Se descubrió que la combinación del compuesto A y (cisplatino y 5-FU) con docetaxel era sinérgica en la  $\text{Cl}_{30}$  de cada agente anticanceroso. El compuesto A y el docetaxel a la concentración de  $\text{Cl}_{30}$  mostraron citotoxicidad de 11,77% y 20,02 respectivamente. (Cisplatino y 5-FU) a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$ , mostraron una citotoxicidad del 51,39%. Sin embargo, cuando se usaron como una combinación de docetaxel a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$  durante 12 horas seguido de (cisplatino y 5-FU) a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$  durante 12 horas, seguido por el compuesto A a una concentración de  $\text{Cl}_{30}$  durante 48 horas, se observó un aumento en la citotoxicidad en la medida de 98,24%, con un índice de combinación de 0,12. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 25 y se presentan gráficamente en la figura 14b.

Agente anticanceroso (células FADU) (Concentración inhibitoria en $\mu\text{M}$ )	Citotoxicidad %	Índice de combinación (valores de I.C.)
Docetaxel $\text{Cl}_{10}$	14,69	--
Docetaxel $\text{Cl}_{30}$	20,02	--
Cisplatino $\text{Cl}_{10}$	9,16	--
Cisplatino $\text{Cl}_{30}$	9,08	--
5-FU $\text{Cl}_{10}$	6,81	--
5-FU $\text{Cl}_{30}$	19,29	--
Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	11,77	--
Compuesto A $\text{Cl}_{50}$	23,86	--
Cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$	39,03	1,15
Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$	51,39	0,91
Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ )	59,95	0,94
Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ )	70,28	0,89
Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ )	71,16	0,84
Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ )	67,80	0,85
Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$ )	74,93	0,63
Docetaxel $\text{Cl}_{10}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	84,83	0,67
Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{10}$ + 5FU $\text{Cl}_{10}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	92,67	0,31
Docetaxel $\text{Cl}_{30}$ + (Cisplatino $\text{Cl}_{30}$ + 5FU $\text{Cl}_{30}$ ) + Compuesto A $\text{Cl}_{30}$	98,24	0,12

## Ejemplo 13

## Análisis de los niveles de expresión de caspasa-3 con escisión

5 Este estudio se realizó para evaluar los mecanismos mediante los cuales la combinación que consiste en sorafenib o lapatinib en combinación con el compuesto A o el compuesto B bloquea la proliferación de y si puede inducir la apoptosis en células cancerosas de cabeza y cuello. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $7,5 \times 10^3$  células/pocillo. 24 Horas después de la siembra, el medio básico esencial se reemplazó con un medio básico esencial nuevo con suero al 10%. Los agentes anticancerosos (sorafenib o lapatinib en combinación con el compuesto A o el compuesto B) se trataron con una concentración específica como se menciona a continuación en células SCC-25, Detroit-562 y FADU y se incubaron durante 48 horas. Al final de las 48 horas, para determinar la expresión de la proteína, las células se centrifugaron en placas de 96 pocillos a 800 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante del cultivo y se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de ensayo de caspasa-3 y las placas se centrifugaron nuevamente a 800 g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y las células se lisaron con 100  $\mu$ l de tampón de lisis de caspasa-3 y se incubaron durante 30 minutos en un agitador orbital a 300 rpm a temperatura ambiente. Se centrifugaron placas adicionales a 800 g durante 10 minutos y se transfirió 90  $\mu$ l del sobrenadante a una nueva placa de pocillos negros. A 90  $\mu$ l de solución de lisis se añadió 100  $\mu$ l de sustrato de caspasa-3 y se incubó durante 30 minutos a 37° C. Al final de la incubación, las placas se leyeron en un lector multimodo Tecan Safire con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm.

20 A) Patrón de tratamiento del sorafenib y el compuesto A o compuesto B en células SCC-25 para evaluar la actividad de caspasa-3

El tratamiento con sorafenib durante 24 horas seguido del compuesto A o compuesto B durante 48 horas mostró una elevación mayor de la expresión de caspasa-3 que cuando se usó solo. También se observó que tanto el compuesto A como el compuesto B eran más potentes en la inducción de la actividad caspasa-3 en combinación como se representa gráficamente en la figura 15a y la figura 15b.

B) Patrón de tratamiento del lapatinib y el compuesto A o compuesto B en células SCC-25 para evaluar la actividad de caspasa-3

El tratamiento con lapatinib durante 24 horas seguido por el compuesto A o el compuesto B durante 48 horas mostró una elevación notable de la expresión de caspasa-3 comparado con cuando se usa solo. También se observó que tanto el compuesto A como el compuesto B eran más potentes en la inducción de la actividad caspasa-3 en combinación como se representa gráficamente en la figura 16a y la figura 16b.

## Ejemplo 14

Estudios de eficacia *in vivo* en xenoinjertos FaDu (carcinoma de células escamosas de hipofaringe) en cáncer de cabeza y cuello humano

35 Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo según el método descrito en Clinical Cancer Search, 2003, 9, 6052-6061.

## Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antitumoral del compuesto A en combinación con cetuximab o en combinación con ambos, cisplatino y cetuximab en el modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello humano de FaDu.

40 Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo usando modelos de xenoinjerto en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) cepa -CbySmn.CB17-Prkdcscid/J, mediante el método descrito a continuación. Se eligió el número estadísticamente significativo de ratones por grupo (n=6) para poder evaluar estadísticamente los datos del estudio.

## Método

45 Las células FaDu se cultivaron en medio MEM (medio esencial básico) que contenía aminoácidos no esenciales y 10% de suero de ternera fetal en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% a 37° C. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Las células se volvieron a suspender en una mezcla de solución salina enfriada previamente para obtener un recuento de  $6 \times 10^6$  células por ml; 0,2 ml de esta suspensión celular se mantuvo en hielo y se inyectó por vía subcutánea (sc) en ratones SCID. Los ratones se observaron en días alternos en cuanto a la masa tumoral palpable. Una vez que el tamaño tumoral alcanzó un tamaño de 3-5 mm de diámetro, los animales se asignaron al azar a grupos respectivos de tratamiento y controles no tratados. Los grupos de tratamiento comprendieron 5 grupos a saber, 1) compuesto A solo (Grupo 1); 2) cetuximab solo (Grupo 2); 3) cisplatino solo (Grupo 3); 4) compuesto A + cetuximab (Grupo 4); y 5) compuesto A + cisplatino + cetuximab (Grupo 5). El grupo de control no recibió tratamiento. En el tratamiento con un solo fármaco, es decir con respecto a los

5 Grupos 1, 2 y 3, el compuesto A (35 mg/kg) se administró por vía i.p. una vez al día durante 5 días a la semana comenzando desde el día 1 de la semana durante 3 semanas con un total de 15 dosis; cisplatino (1 mg/kg) se administró por vía i.p. una vez por semana el día 1 de la semana con un total de 3 dosis. Cetuximab (2,5 mg/kg) se administró dos veces a la semana los días 1 y 4 de la semana durante 3 semanas con un total de 6 dosis. En el tratamiento con combinación de fármacos, concretamente el compuesto A y cetuximab, la secuencia que se siguió incluía la administración del Compuesto A durante 2 horas seguido de cetuximab:

10 En el tratamiento con una combinación de fármacos, concretamente compuesto A, cisplatino y cetuximab, la secuencia que se siguió incluía la administración de cisplatino durante 2 horas seguido del compuesto A durante 2 horas, seguido de cetuximab. La medición del tumor se hizo cada 2-3 días. El porcentaje de inhibición del crecimiento (GI%) se calculó al final del experimento.

Procedimientos terminales:

Al final del experimento, los animales se sometieron a eutanasia usando altas dosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg i.p./i.v.) o la exposición a gas dióxido de carbono.

Resultados

15 Los resultados son los presentados en la Tabla 26 y se presentan gráficamente en la figura 17a. La figura 17a representa el peso corporal medio del grupo durante el período de administración del fármaco (agentes terapéuticos) representado. La figura 17b representa el % de peso tumoral promedio del xenoinjerto de carcinoma de cabeza y cuello (Fadu) durante un período de 18 días.

Tabla 26: porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral al final del tratamiento, es decir, después de 18 días.

Grupos	Inhibición del crecimiento tumoral (%)
Grupo 1 (compuesto A)	11
Grupo 2 (cisplatino )	4
Grupo 3 (cetuximab )	45
Grupo 4 (combinación de compuesto A y cetuximab)	79
Grupo 5 (combinación de cisplatino, compuesto A y cetuximab)	77

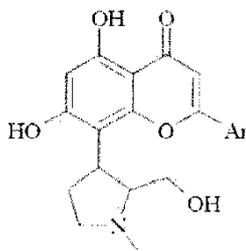
20 La inhibición del crecimiento tumoral fue altamente significativa con  $p < 0,001$  en los grupos de tratamiento, a saber, Grupo(s) 4 y 5 lo que implica el uso de la combinación de agentes antineoplásicos con una inhibición del crecimiento tumoral (TG) del 79% y 77% respectivamente. No hubo una pérdida significativa de peso corporal en todos los grupos de tratamiento.

25 Conclusión

La combinación de compuesto A y cetuximab y la combinación de compuesto A, cetuximab y cisplatino mostraron una actividad antitumoral similar en el modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello humano de FaDu y fue significativamente más alta que con cualquiera de los fármacos solo.

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en donde dicha combinación farmacéutica comprende un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de fórmula I,



Formula I

- 5
- en donde, Ar es un grupo fenilo, que está sin sustituir o sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de: halógeno, nitro, ciano, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, trifluorometilo, hidroxilo y alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel.
- 10 2. La combinación farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en donde en el compuesto de fórmula I el grupo fenilo está sustituido con 1, 2, o 3 sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de cloro, bromo, flúor, yodo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y trifluorometilo; o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. La combinación farmacéutica para uso según la reivindicación 2, en donde en el compuesto de fórmula I el grupo fenilo está sustituido con cloro.
- 15 4. La combinación farmacéutica para uso según la reivindicación 3, en donde el compuesto de fórmula I es el clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (compuesto A).
5. La combinación farmacéutica para uso según la reivindicación 2, en donde en el compuesto de fórmula I el grupo fenilo es un grupo sustituido con 2 sustituyentes diferentes seleccionados de cloro y trifluorometilo.
- 20 6. La combinación farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en donde el compuesto de fórmula I es el clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (Compuesto B).
7. La combinación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, en donde dicho agente antineoplásico es el sorafenib.
- 25 8. La combinación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, en donde dicho agente antineoplásico es el lapatinib.
9. La combinación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, en donde dicho agente antineoplásico es el erlotinib.
10. La combinación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, en donde dichos agentes antineoplásicos son el cisplatino y 5-fluorouracilo.
- 30 11. La combinación farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, en donde dicha combinación farmacéutica comprende además la radiación.
12. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de CDK seleccionado de los compuestos de Fórmula I o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos y 1) uno o más agentes antineoplásicos seleccionados de sorafenib, lapatinib, erlotinib, y cetuximab, 2) cisplatino y 5-fluorouracilo, o 3) cisplatino, 5-fluorouracilo y docetaxel, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.
- 35 13. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 12, en donde un compuesto de Fórmula I es el clorhidrato de (+)-*trans*-2-(2-cloro-4-trifluorometil-fenil)-5,7-dihidroxi-8-(2-hidroximetil-1-metil-pirrolidin-3-il)-cromen-4-ona (Compuesto B).
- 40

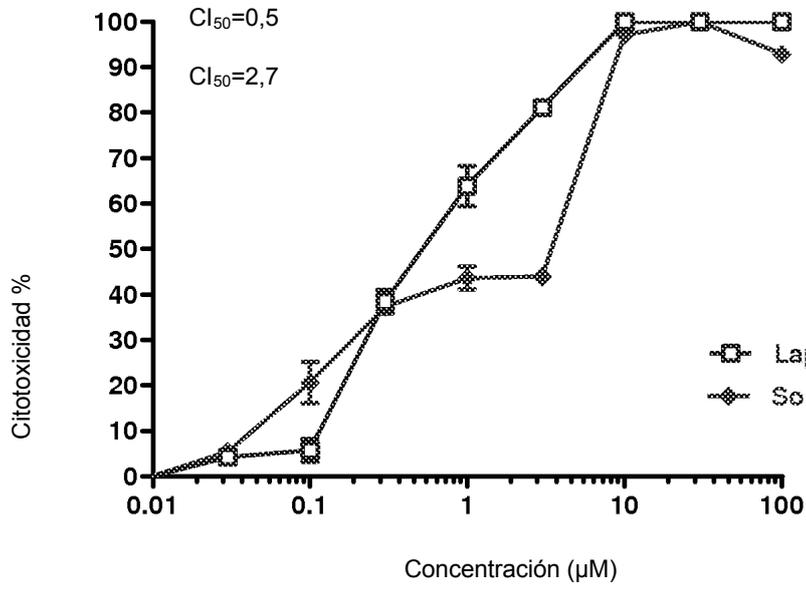


Figura 1a

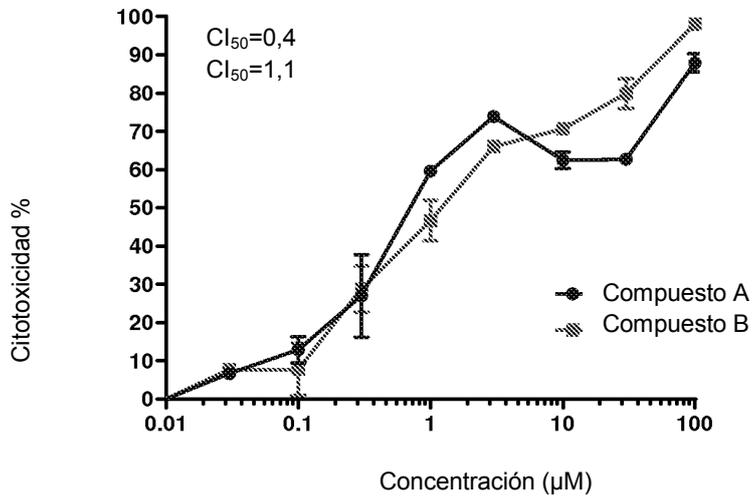


Figura 1b

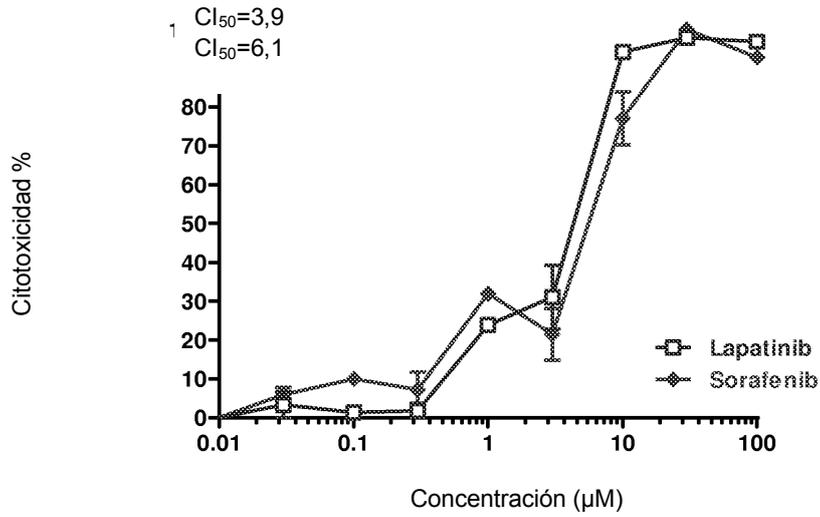


Figura 2a

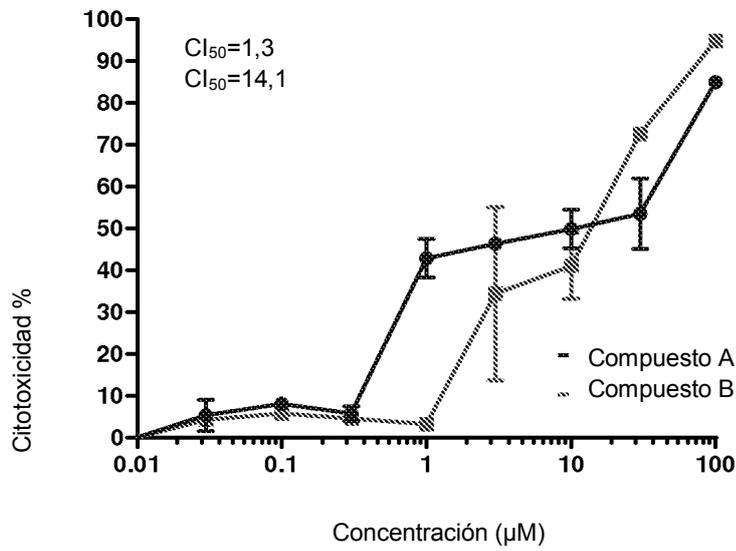


Figura 2b

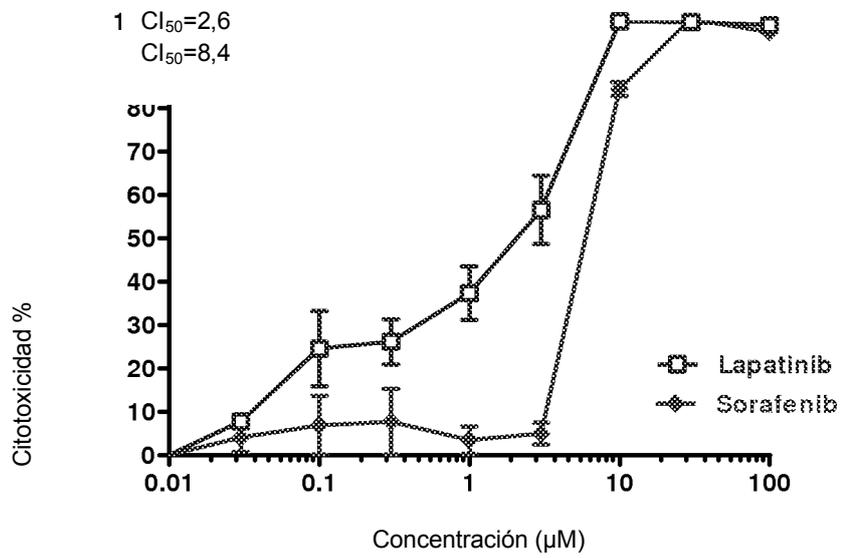


Figura 3a

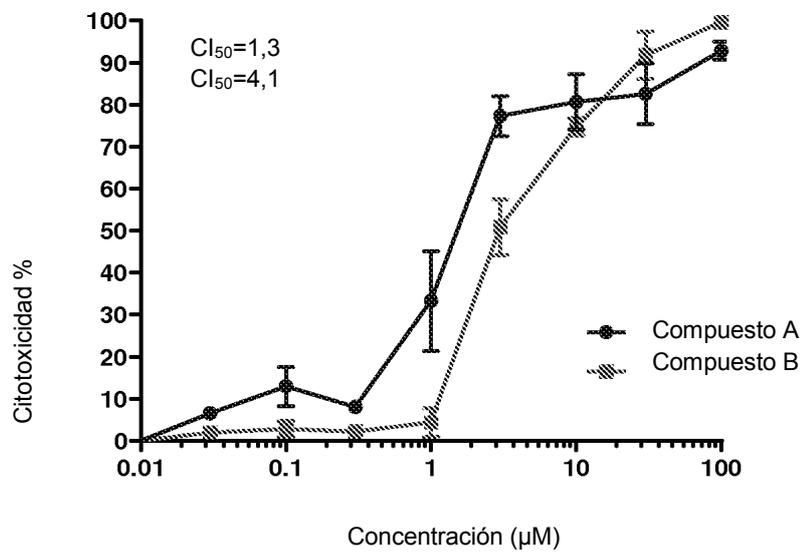


Figura 3b

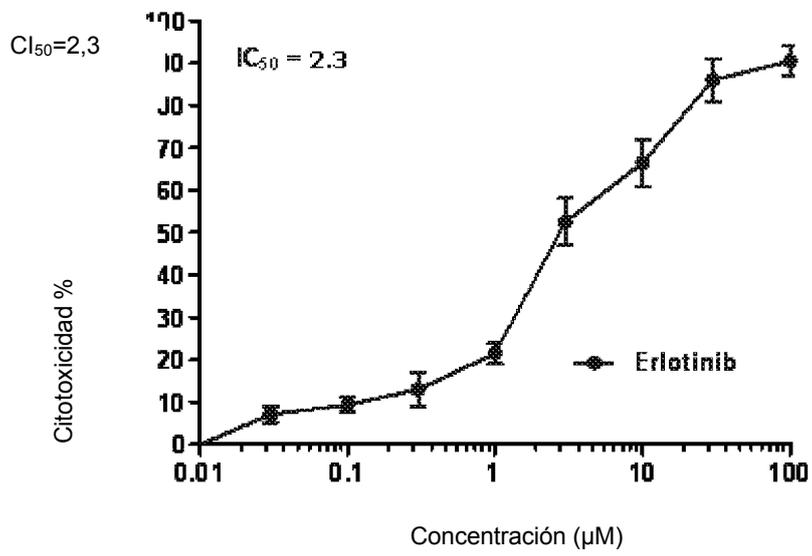


Figura 4a

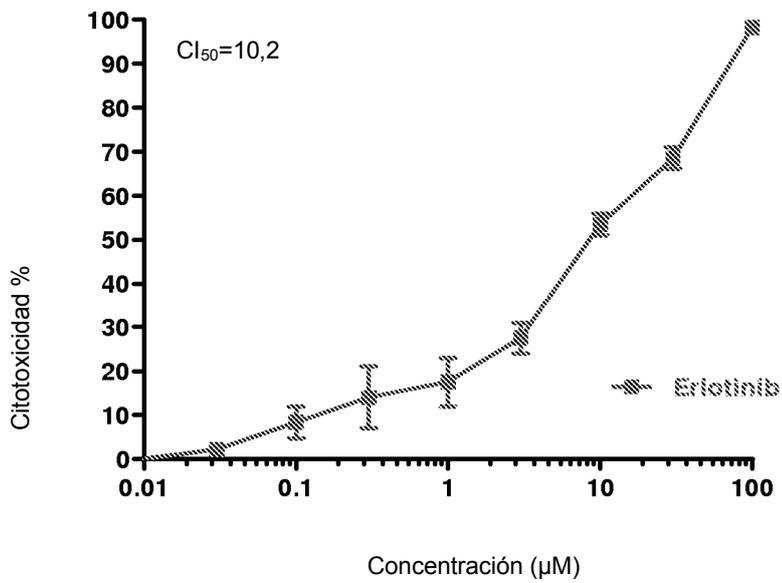


Figura 4b

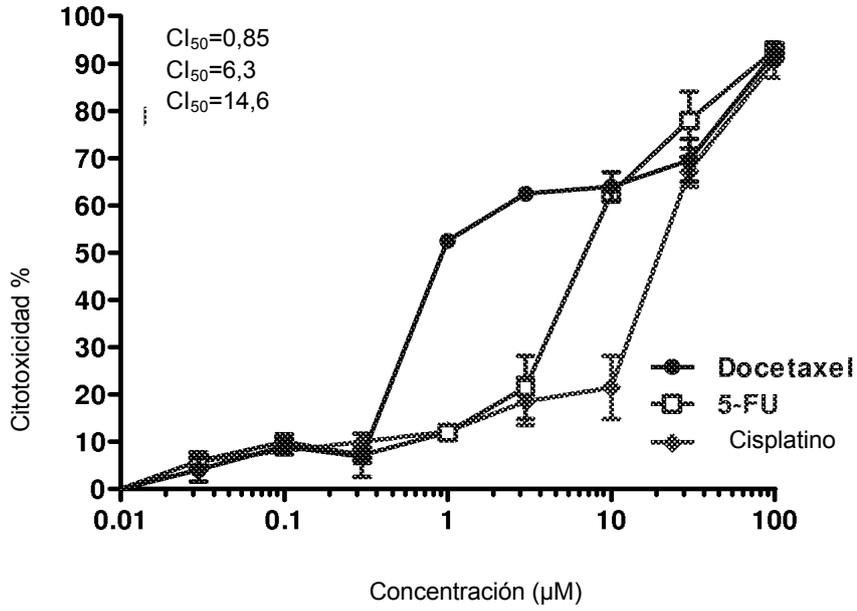


Figura 5a

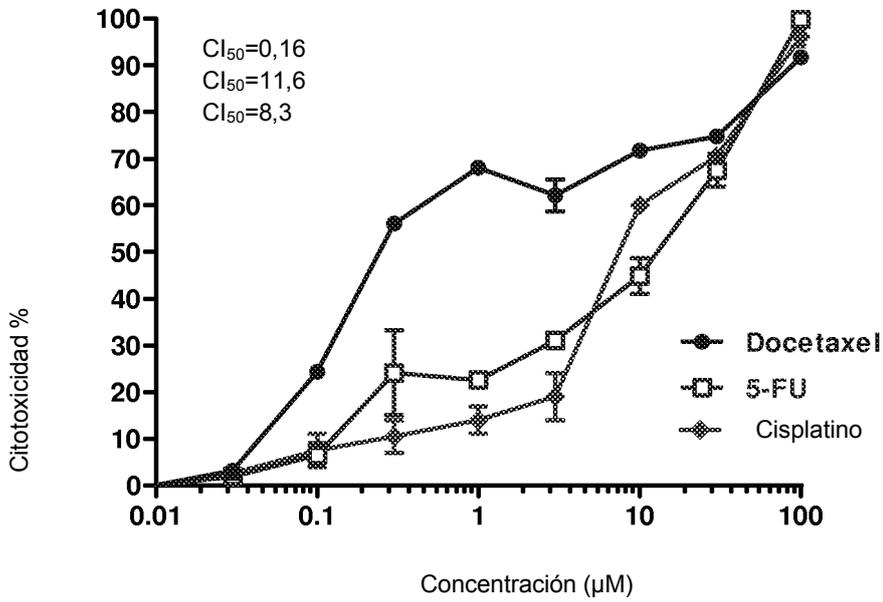


Figura 5b

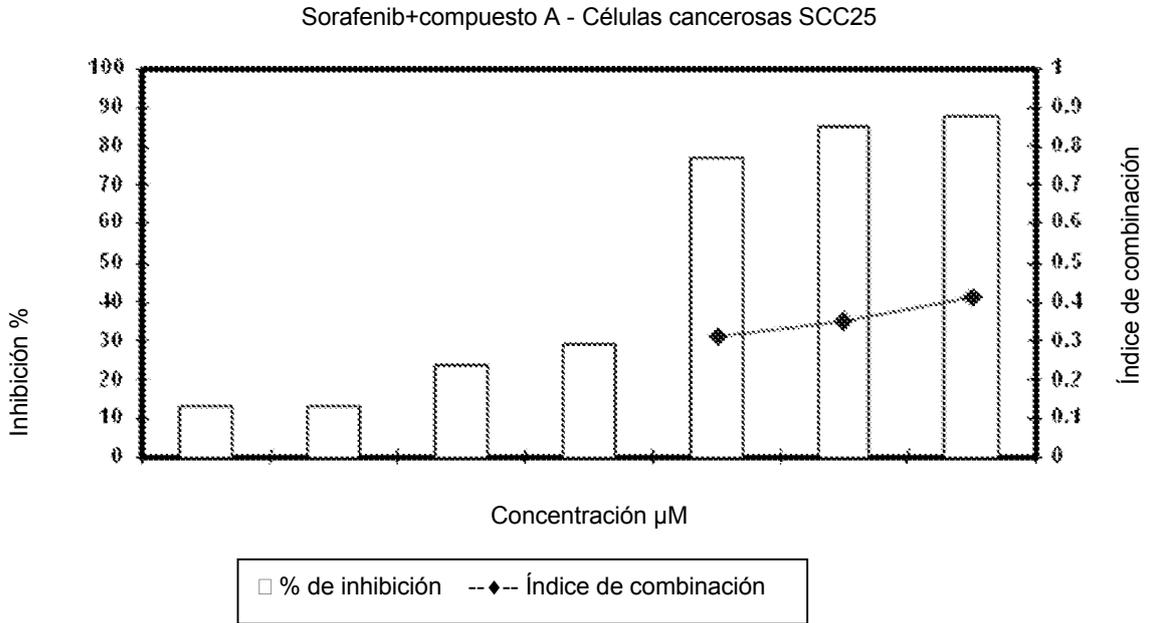


Figura 6a

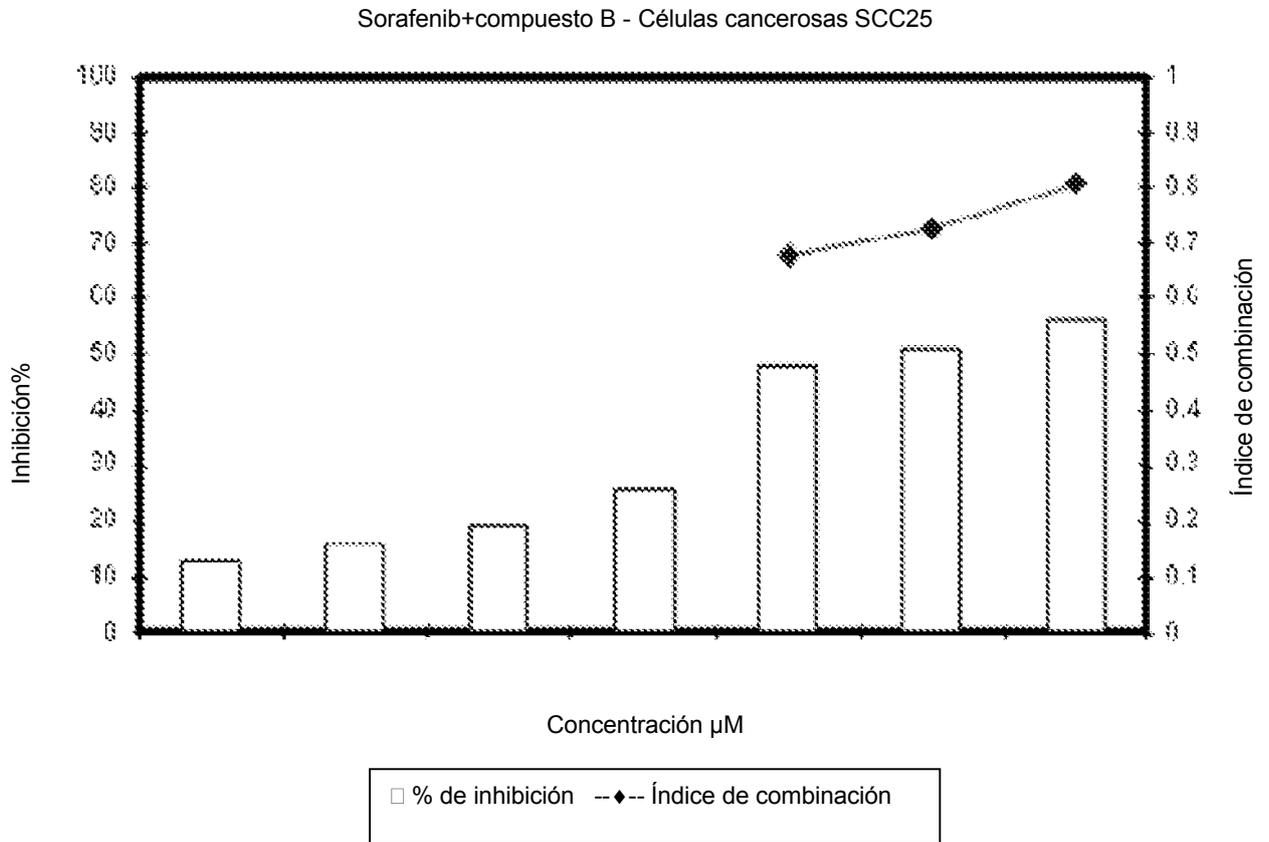


Figura 6b

Sorafenib+compuesto A - Células cancerosas Detroit 562

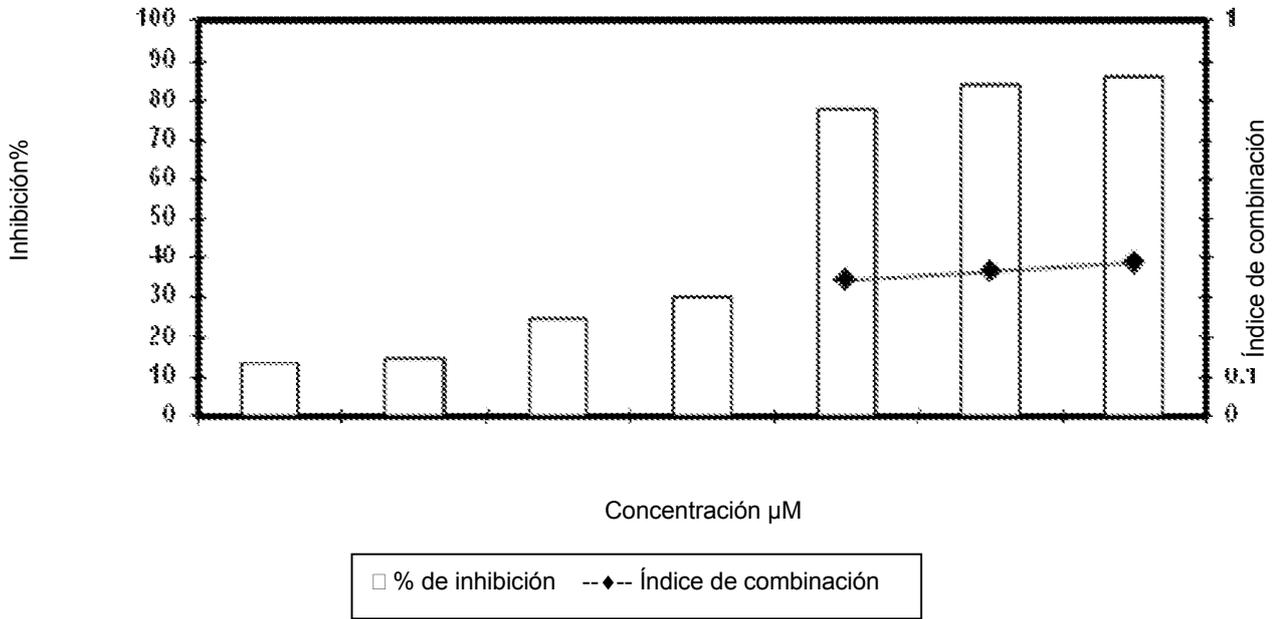


Figura 7a

Sorafenib+compuesto B - Células cancerosas Detroit 562

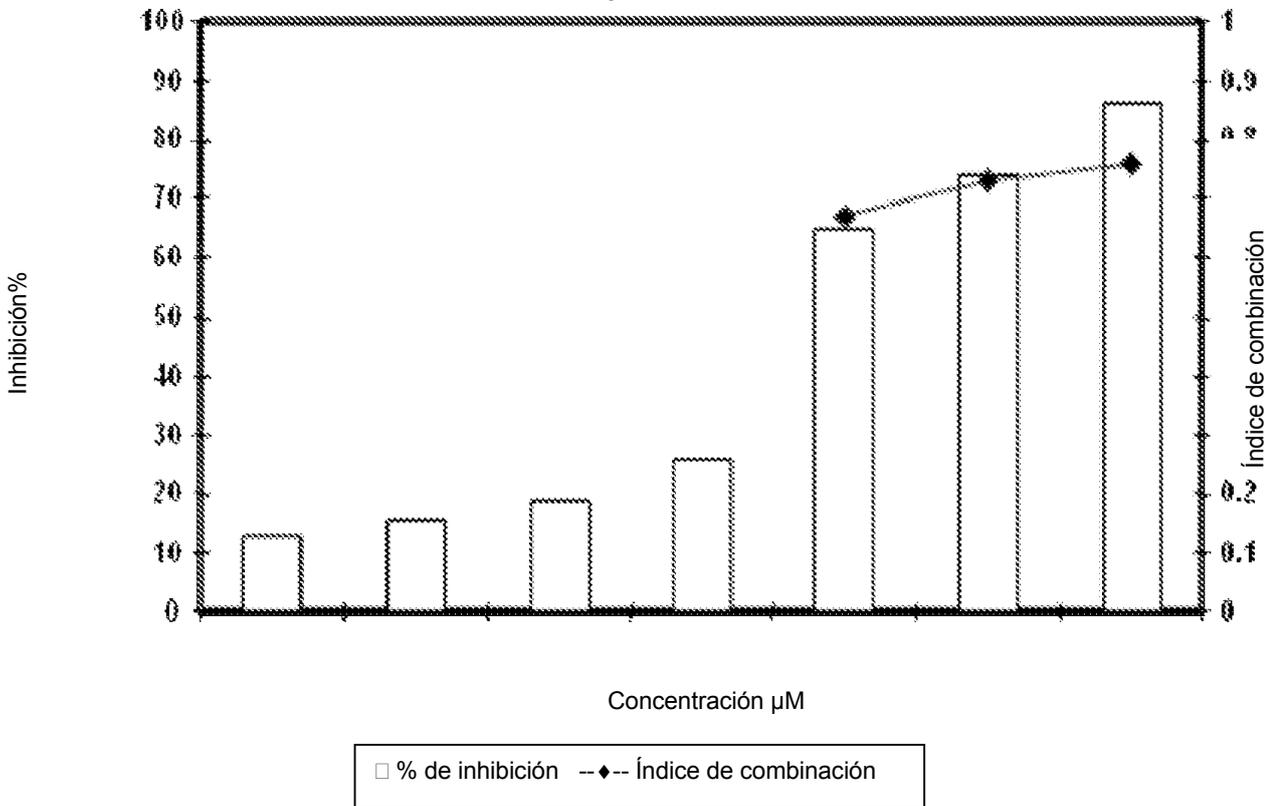


Figura 7b

Sorafenib+compuesto A - Células cancerosas FADU

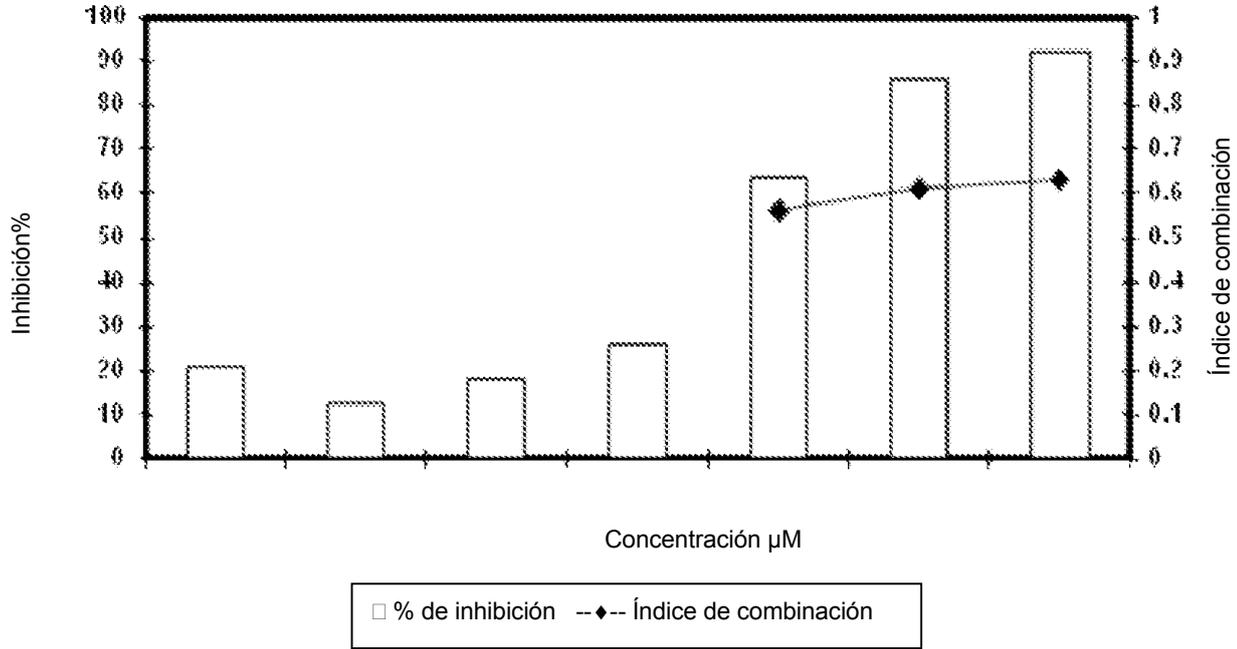


Figura 8a

Sorafenib+compuesto B - Células cancerosas FADU

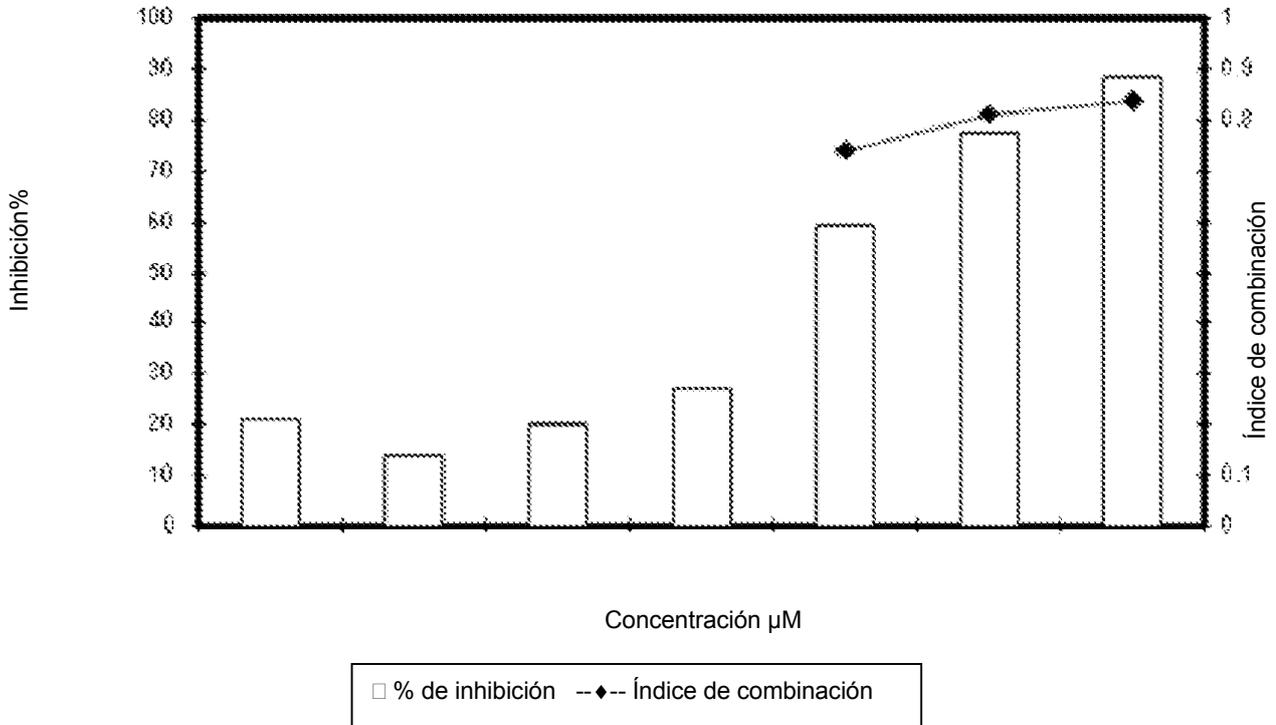


Figura 8b

Lapatinib+compuesto A - Células cancerosas SCC25

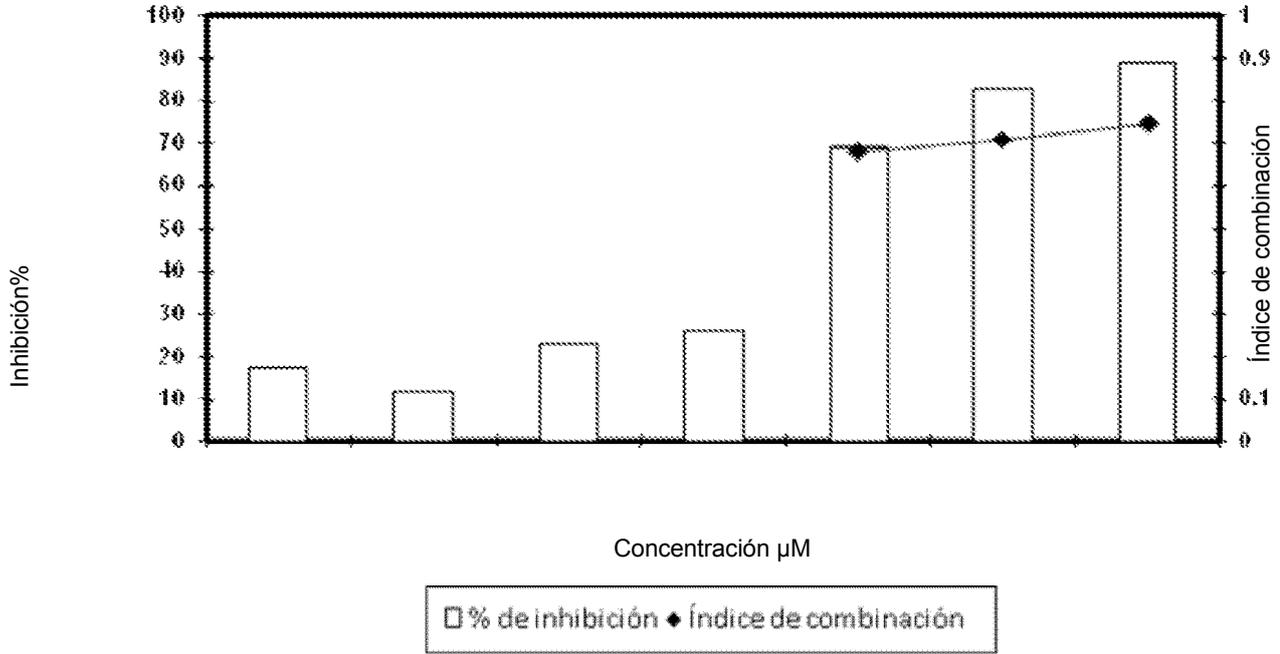


Figura 9a

Lapatinib+compuesto B - Células cancerosas SCC25

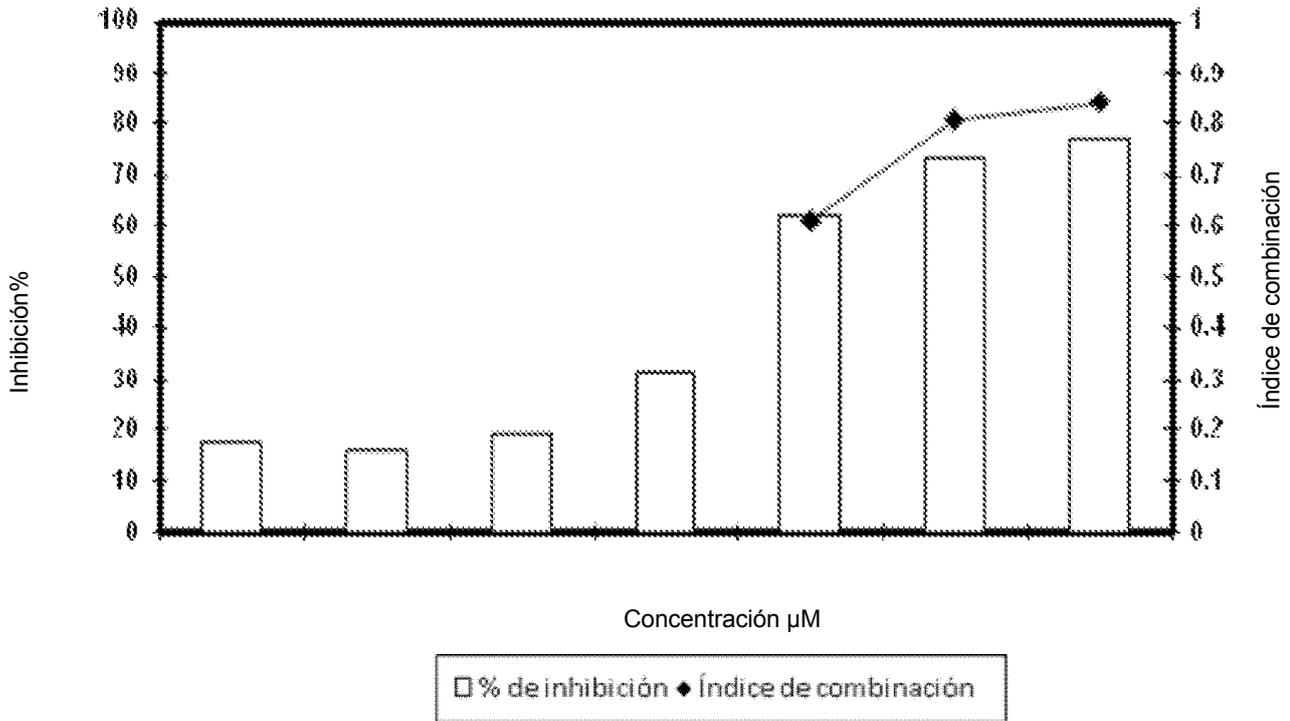


Figura 9b

Lapatinib+compuesto A - Células cancerosas Detroit-562

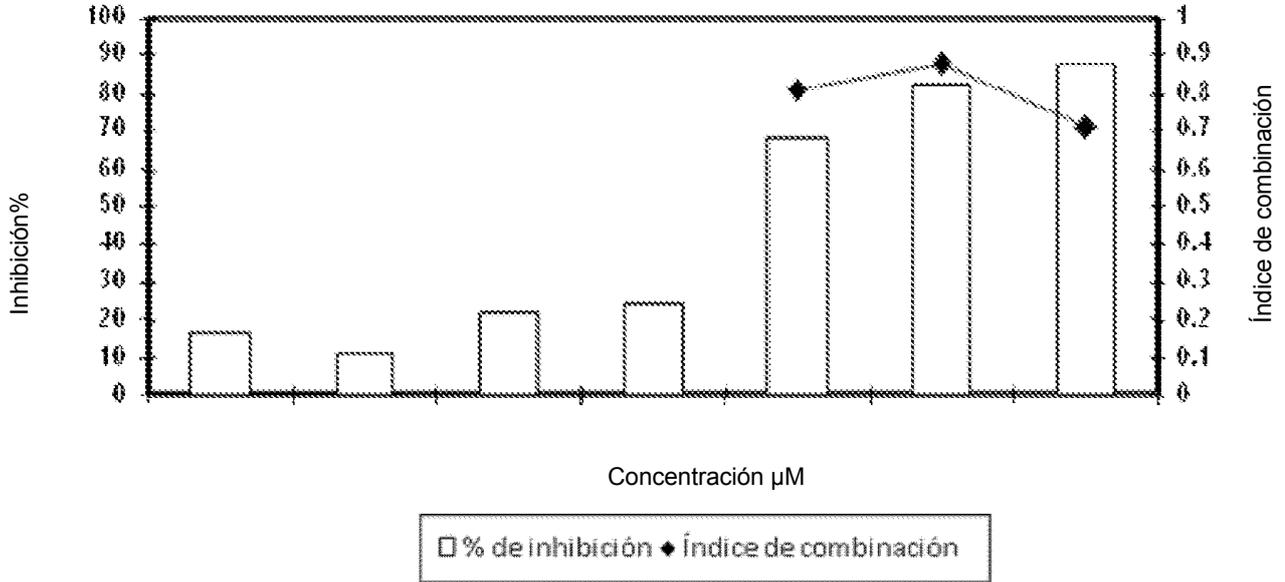


Figura 10a

Lapatinib+compuesto B - Células cancerosas Detroit-562

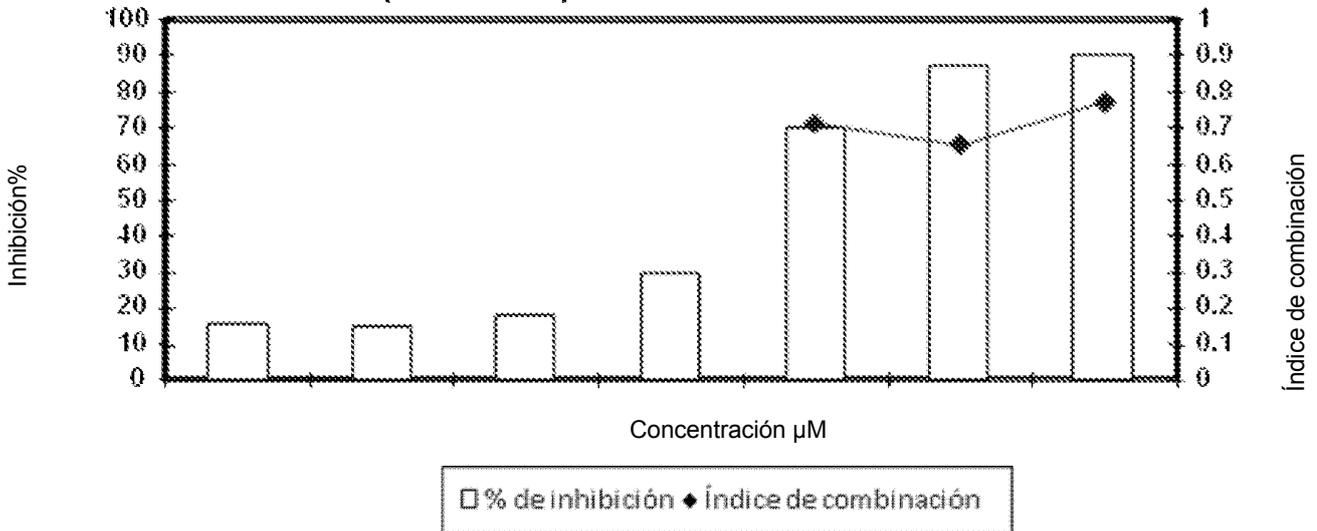


Figura 10b

Lapatinib+Compuesto A Células de cáncer FADU

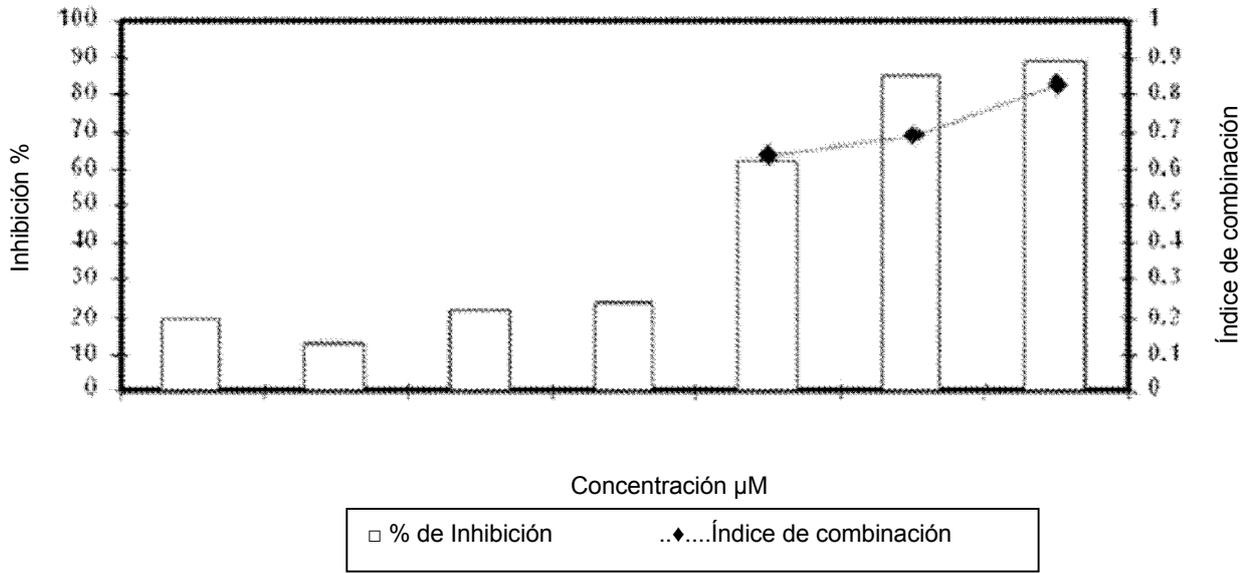


Figura 11a

Lapatinib+compuesto B - Células cancerosas FADU

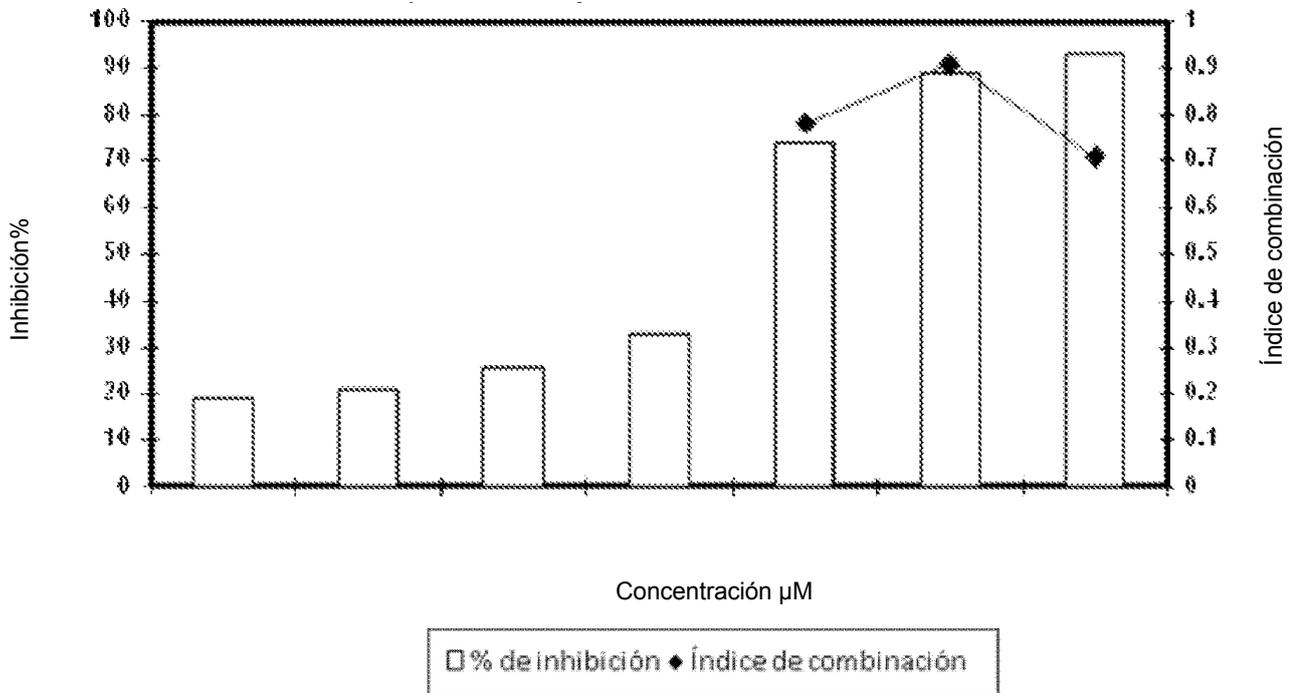


Figura 11b

Detroit 562

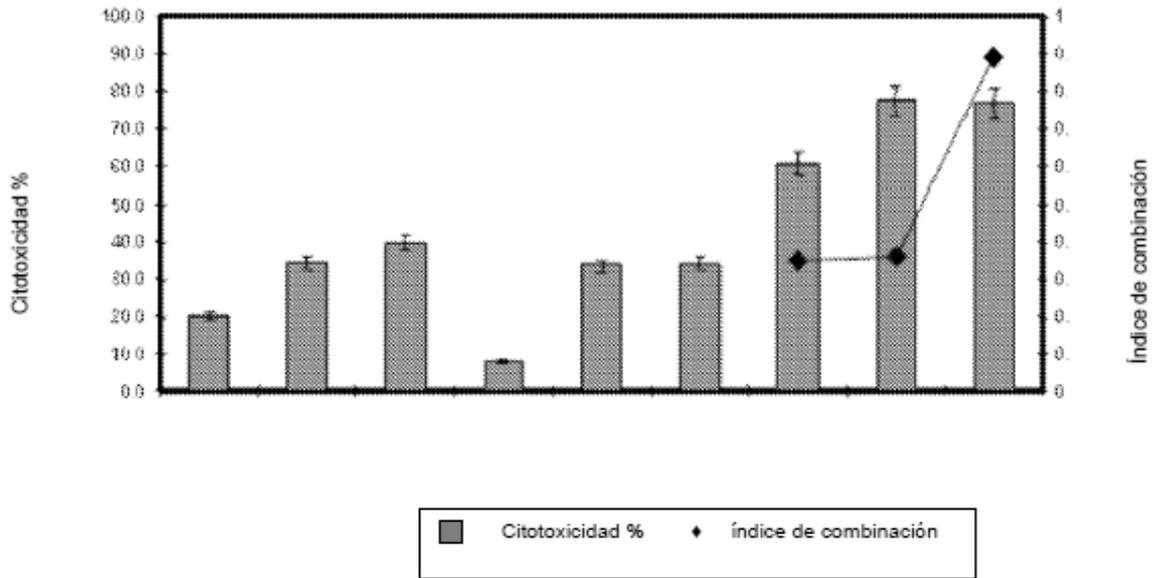


Figura 12a

FADU

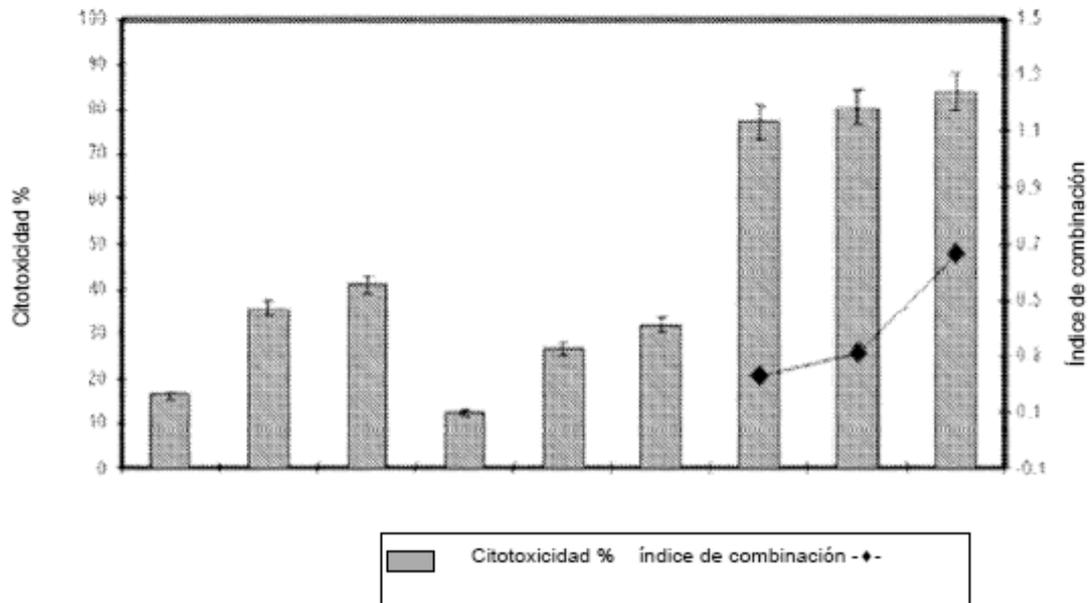


Figura 12b

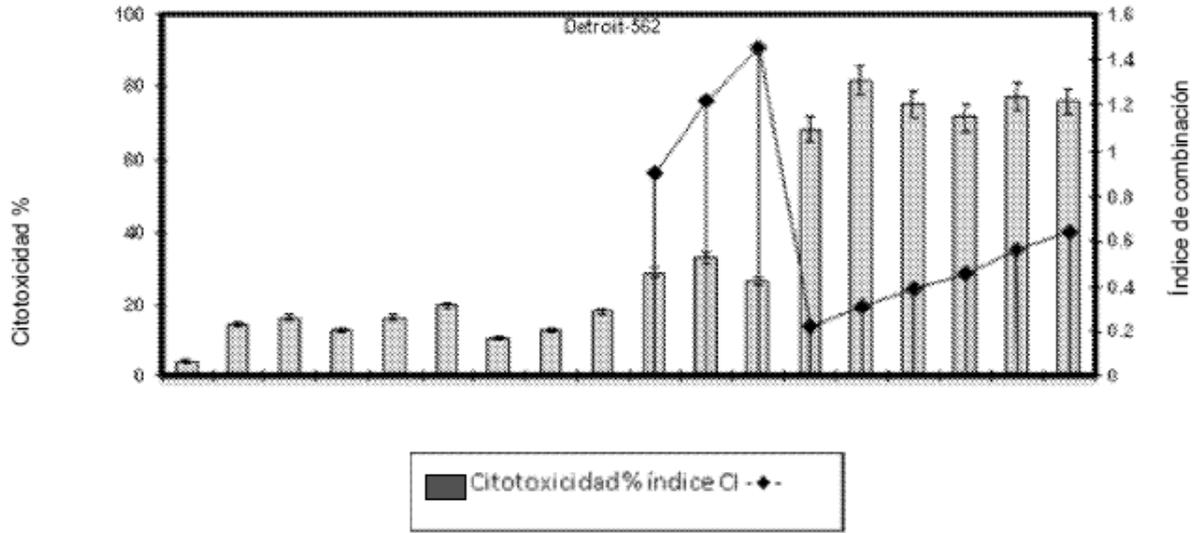


Figura 13a

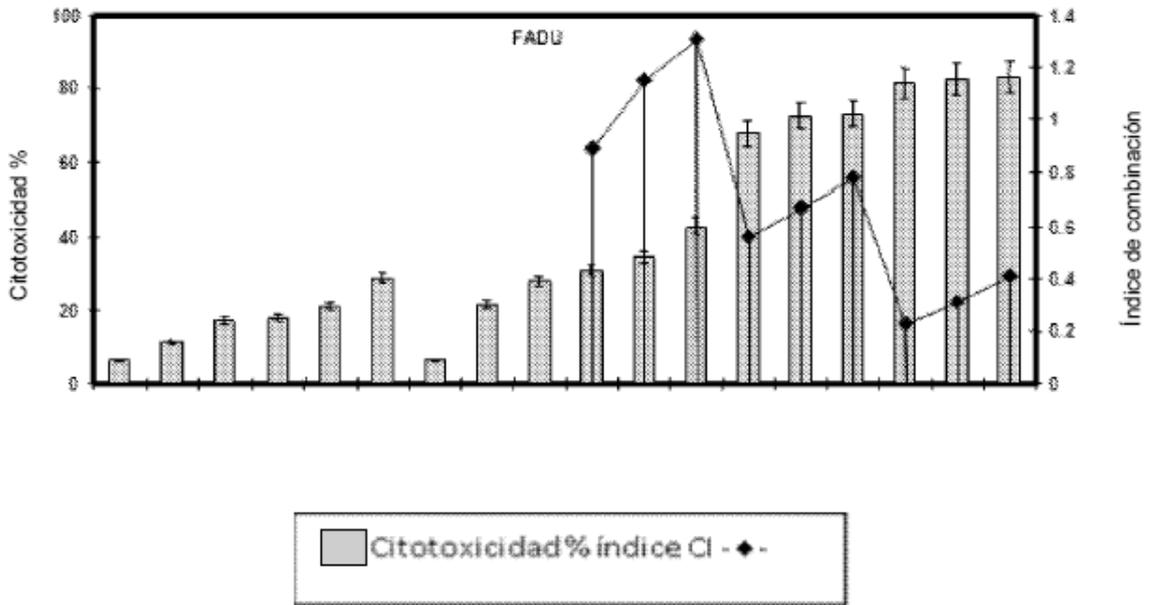


Figura 13b

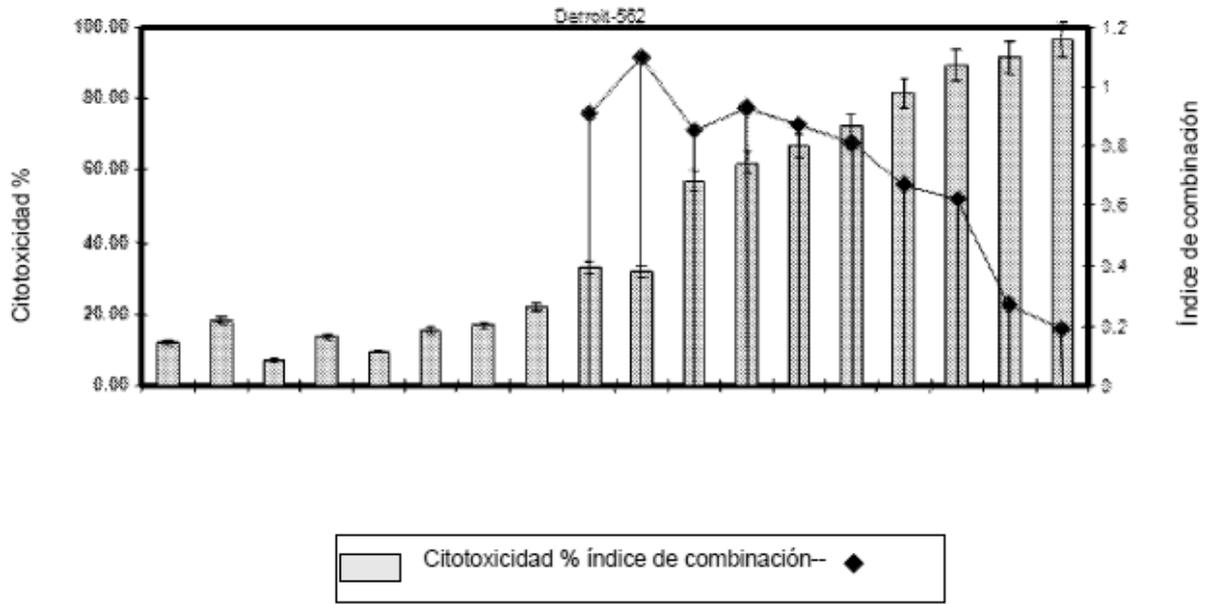


Figura 14a

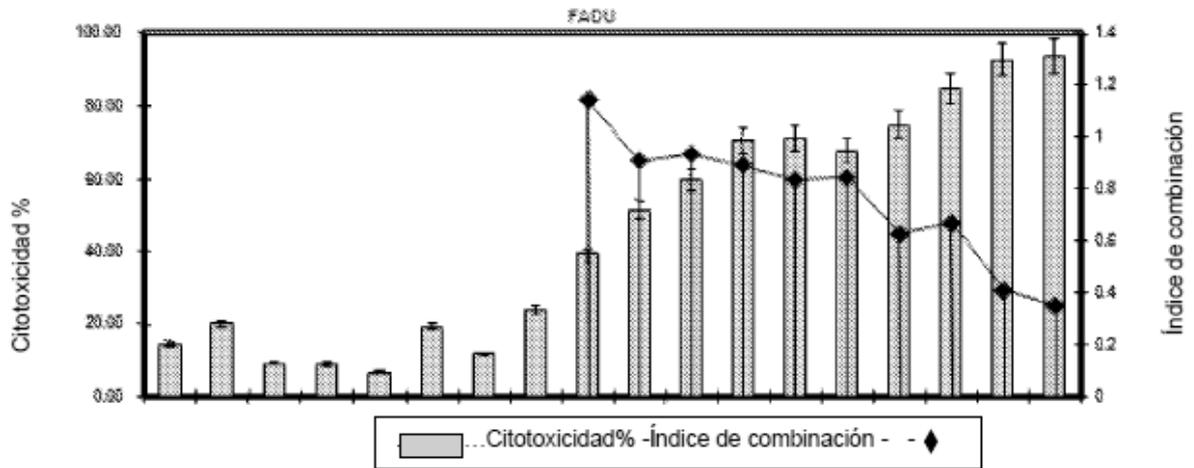


Figura 14b

Actividad de caspasa-3: Sorafenib + Compuesto A

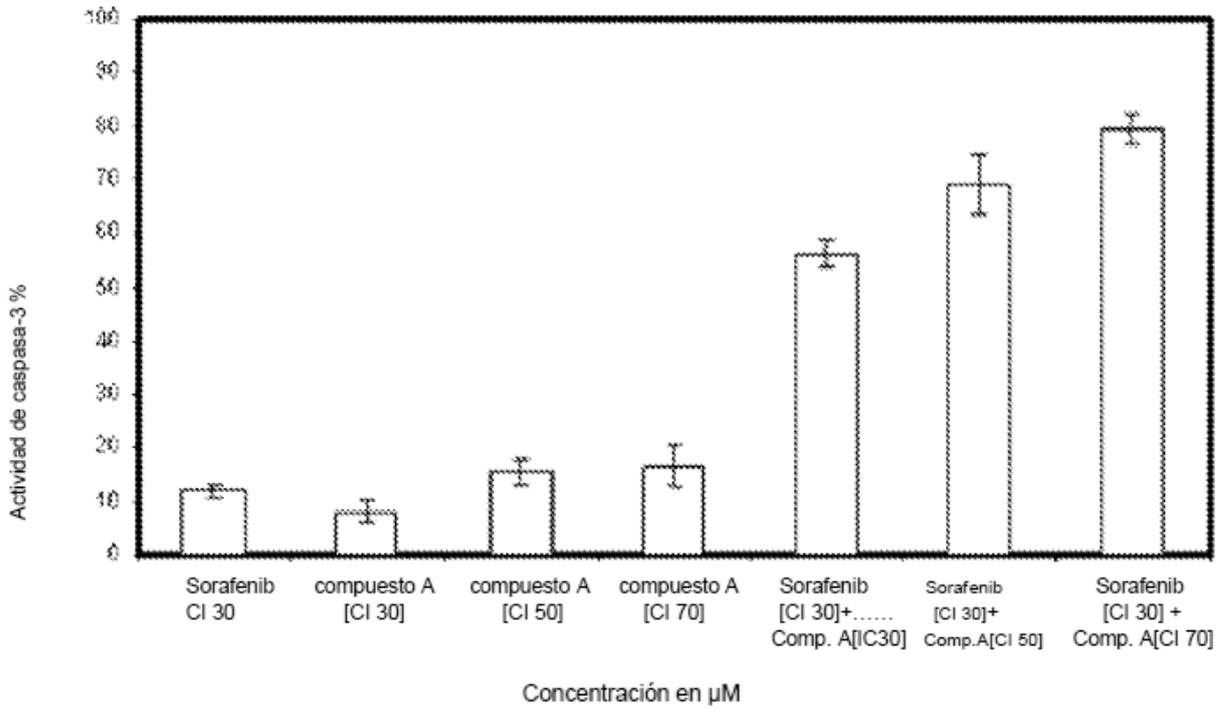


Figura 15a

Actividad de Caspasa-3: Sorafenib + Compuesto B

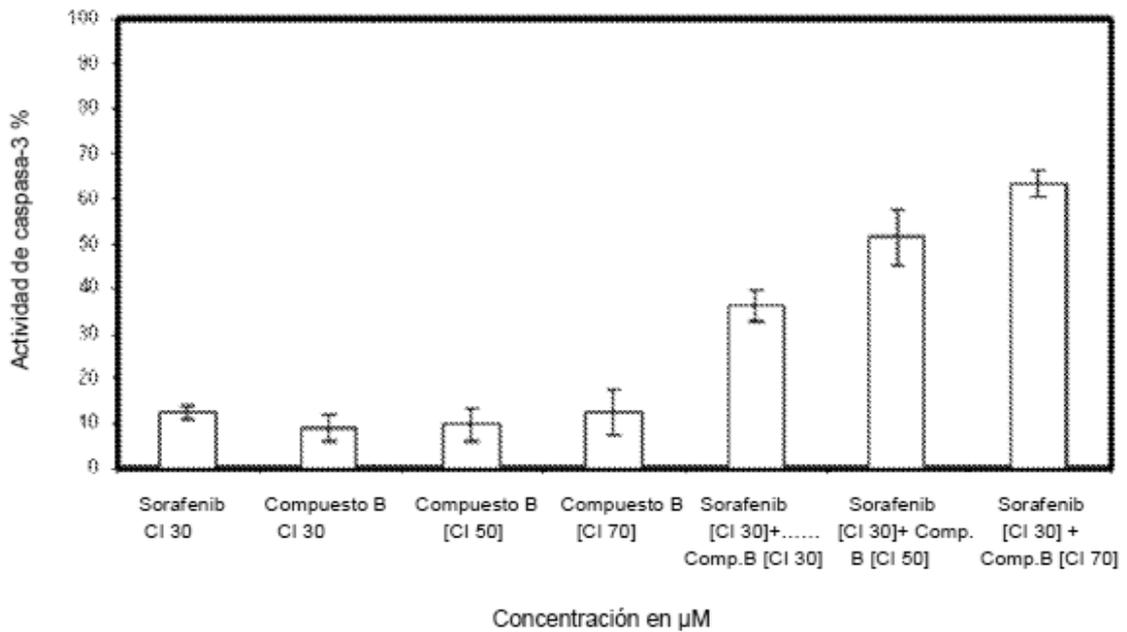
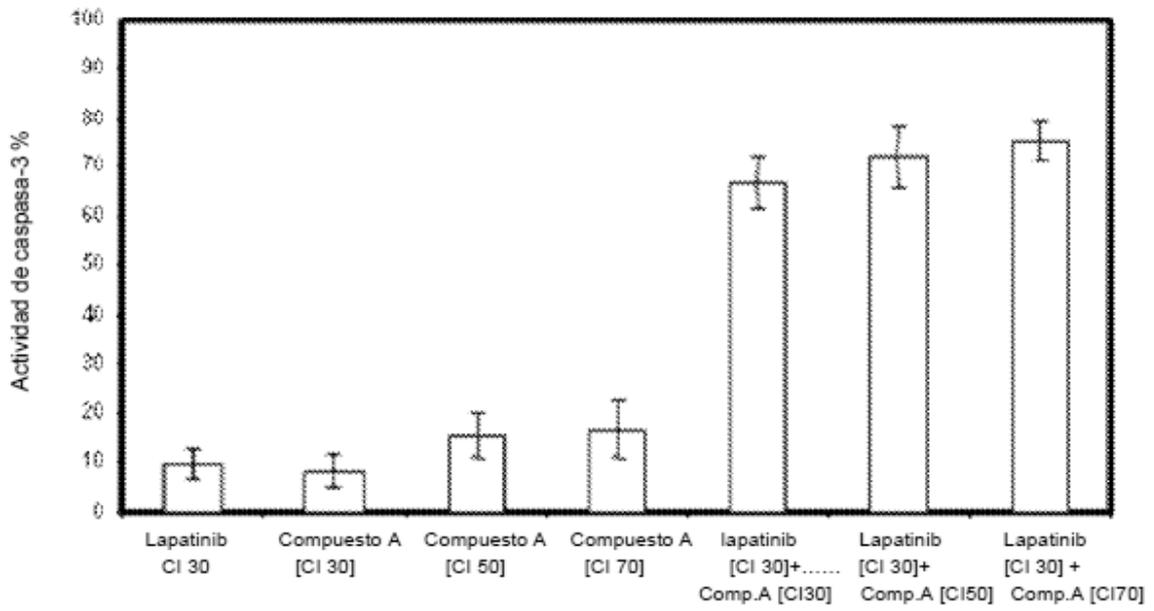


Figura 15b

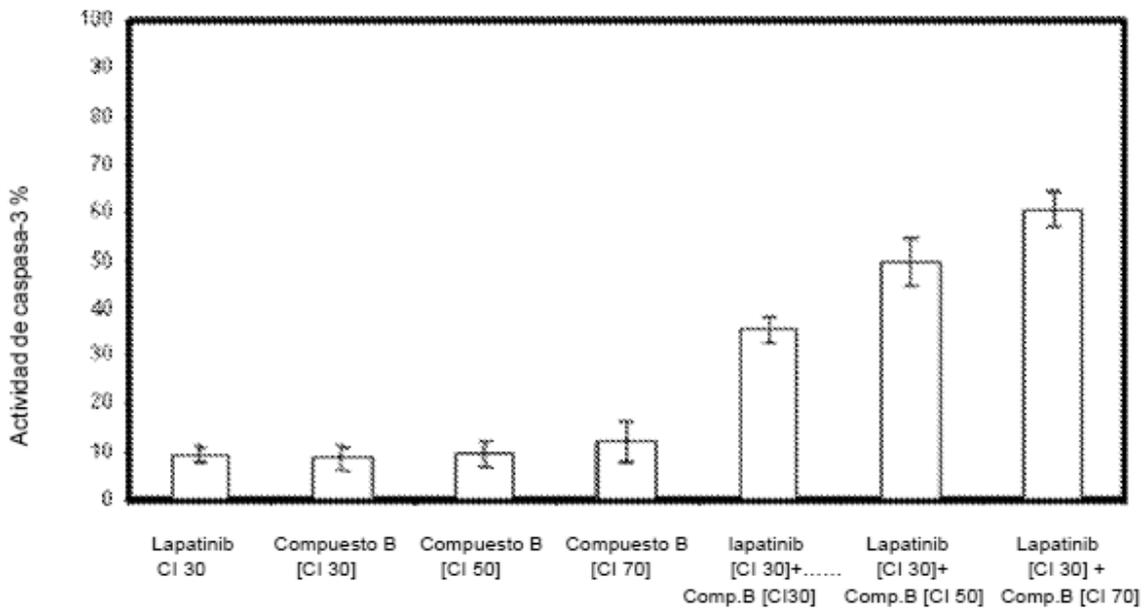
Actividad de Caspsa-3: Lapatinib + Compuesto A



Concentración en  $\mu\text{M}$

Figura 16a

Actividad de Caspsa-3: Lapatinib + Compuesto B



Concentración en  $\mu\text{M}$

Figura 16b

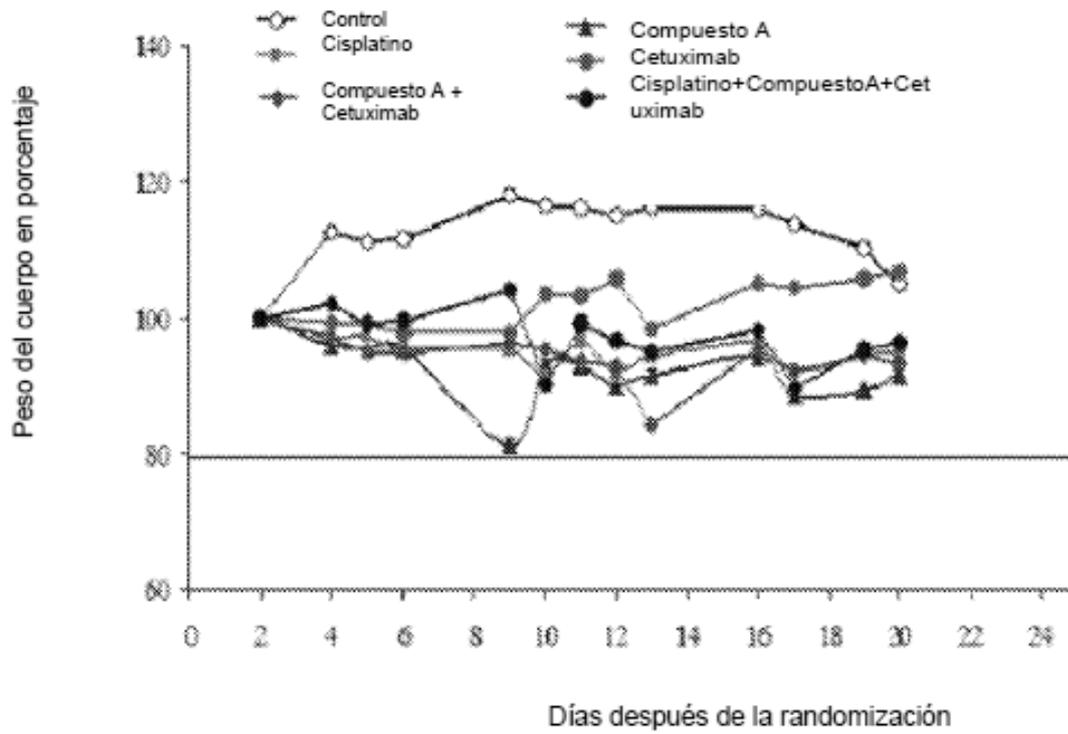


Figura 17a

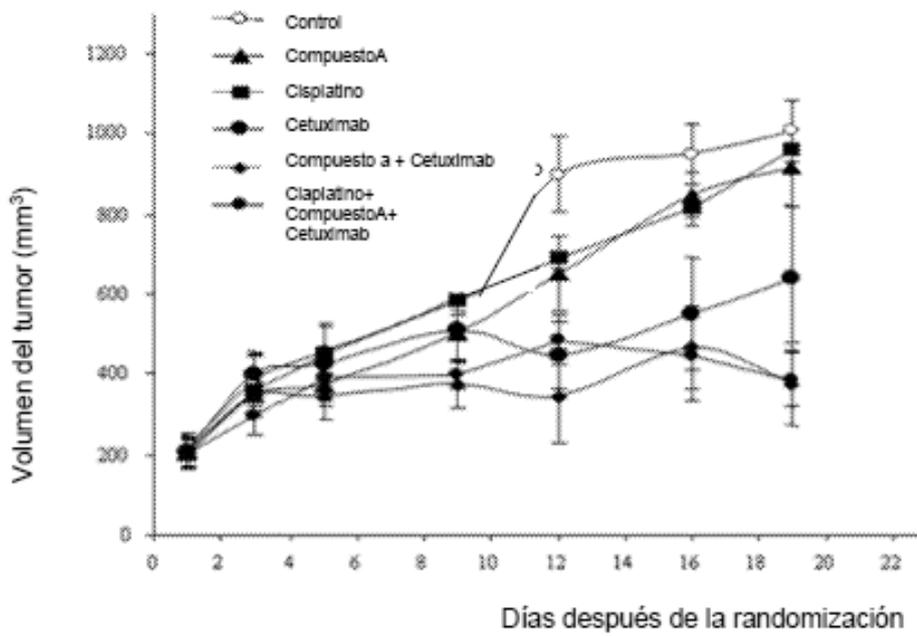


Figura 17b