

**COMBINACIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN INHIBIDOR DE
QUINASA DE TIROSINA DEL RECEPTOR CLASE III Y LA MOLÉCULA
DE FUSIÓN INHIBIDORA DE DEACETILASA DEHISTONA ALQUILANTE
EDO-S101 Y SU USO EN EL TRATAMIENTO
DE CÁNCER**

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a combinaciones útiles en el
tratamiento de cáncer tal como cánceres hematológicos y cáncer de
10 mama.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una de las enfermedades más peligrosas para la
vida. El cáncer es una enfermedad en la que las células en una parte del
cuerpo experimentan un crecimiento descontrolado. De acuerdo con los
15 últimos datos de la Sociedad Americana del Cáncer, se estima que
habrá 1.67 millones de nuevos casos de cáncer en los EE.UU. en 2014.
El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados
Unidos (sólo superada por las enfermedades del corazón) y cobró más
de 585,000 vidas en 2014. De hecho, se estima que el 50% de todos los
20 hombres y el 33% de todas las mujeres que viven en Estados Unidos
desarrollarán algún tipo de cáncer en su vida. Por lo tanto, el cáncer
constituye una importante carga para la salud pública y representa un
costo significativo en los Estados Unidos. Estas cifras se reflejan en
todos lados en la mayoría de los países a nivel mundial, aunque los
25 tipos de cáncer y las proporciones relativas de la población en

desarrollo los cánceres varían dependiendo de muchos factores diferentes, tales como la genética y la dieta.

Durante décadas la cirugía, la quimioterapia y la radiación han sido los tratamientos establecidos para varios tipos de cáncer. Los
5 pacientes reciben generalmente una combinación de estos tratamientos, dependiendo del tipo y grado de su enfermedad. Sin embargo, la quimioterapia es la opción más importante para los pacientes de cáncer cuando el tratamiento quirúrgico (es decir, la eliminación de tejido enfermo) no es posible. Aunque la cirugía a veces es eficaz para eliminar
10 tumores localizados en ciertos sitios, por ejemplo, en la mama, colon y piel, no se puede utilizar en el tratamiento de tumores localizados en otras áreas, tales como la columna vertebral, ni en el tratamiento de cánceres hematológicos diseminados incluyen los cánceres de la sangre y los tejidos que forman la sangre (como la médula ósea). Ellos incluyen
15 mieloma múltiple, linfoma y leucemia. La radioterapia implica la exposición de tejido vivo a la radiación ionizante que causa la muerte o daño de las células expuestas. Los efectos secundarios de la radioterapia pueden ser agudos y temporales, mientras que otros pueden ser irreversibles. La quimioterapia implica la interrupción de la
20 replicación celular o metabolismo celular. Se utiliza con mayor frecuencia en el tratamiento del cáncer de mama, de pulmón y cáncer de testículo. Una de las principales causas del fracaso en este tratamiento del cáncer es el desarrollo de resistencia a los fármacos por las células cancerosas, un problema grave que puede conducir a la recurrencia de
25 la enfermedad o incluso la muerte. Por lo tanto, se necesitan

tratamientos más eficaces contra el cáncer.

El mieloma múltiple es un problema significativo y creciente. Es un cáncer derivado de células plasmáticas. Las células plasmáticas normales producen inmunoglobulinas para combatir la infección. En el mieloma, las células de plasma se vuelven anormales, se multiplican sin control y liberan sólo un tipo de anticuerpo - conocido como paraproteína - que no tiene ninguna función útil. Tiende a acumularse en la médula ósea y circular en la sangre y también puede ser detectada en la orina. Afecta a múltiples sitios en el cuerpo (de ahí el nombre de mieloma "múltiple") en la que la médula ósea es normalmente activa en adultos. Las principales formas de mieloma múltiple (o mieloma como también se le denomina) son mieloma activo, plasmocitoma, mieloma de cadenas ligeras y mieloma no secretora. El número de nuevos casos de mieloma en los Estados Unidos en 2011 fue de 6.1 por cada 100.000 hombres y mujeres por año y la tasa de porcentaje de supervivencia más allá de cinco años fue del 45%. Se estima que el número de casos nuevos en los Estados Unidos en 2014 será de más de 24,000 (1.4% de todos los casos de cáncer), mientras que el número de muertes en el año 2014 será de poco más de 11,000 (1.9% de todos los casos de cáncer).

En el documento WO-A-2010/085377, el compuesto de a fórmula I ha demostrado tener una excelente actividad *in vitro* contra varias líneas celulares de mieloma, con actividades en el intervalo de 35 a 100% mayor que la actividad mostrada por Bendamustina.

La leucemia es un tipo de cáncer de la sangre o de médula ósea

caracterizada por un aumento anormal de los glóbulos blancos inmaduros llamado "blastos". En lugar de producir, el funcionamiento normal de glóbulos blancos funcionales normales para combatir infecciones el cuerpo produce un gran número de estos blastos no funcionales. La leucemia es un término amplio que abarca un espectro de enfermedades. A su vez, es parte del grupo aún más amplio de enfermedades que afectan a la sangre, la médula ósea y el sistema linfático, que son todos conocidos como neoplasias hematológicas. Las formas más comunes son la leucemia aguda linfoblástica (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (CML), con formas menos comunes como la leucemia de células pilosas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande y leucemia linfoblástica aguda de células T. Se estima que el número de casos nuevos en los Estados Unidos en el año 2014 será de más de 52,000 (3.1% de todos los nuevos casos de cáncer en los EE.UU.) con más de 24,000 muertes (4.1% de todas las muertes por cáncer en los EE.UU.). La tasa de supervivencia porcentual durante cinco años es actualmente del 57.2%, una cifra significativamente inferior a la de muchos otros tipos de cáncer, con la tasa de supervivencia en cinco años para la leucemia mieloide aguda es particularmente baja, con sólo el 20%.

El linfoma es un cáncer del sistema linfático. Hay dos tipos principales de linfoma, a saber, el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin.

El linfoma no Hodgkin es la forma más común de linfoma. El

sistema linfático recorre todo el cuerpo, y es por lo tanto posible encontrar el linfoma no Hodgkin en casi todas las partes del cuerpo. En los pacientes con linfoma no Hodgkin, algunos de sus glóbulos blancos (linfocitos) se dividen de forma anormal. Ellos no tienen ningún tiempo
5 de descanso como las células normales y comienzan a dividirse de forma continua, por lo que se producen demasiados. Ellos, naturalmente, no mueren como lo hacen normalmente. Estas células comienzan a dividirse antes de que estén completamente maduras y por lo tanto no pueden combatir la infección, como los glóbulos blancos
10 normales. Todos los linfocitos anormales comienzan a acumularse en los ganglios linfáticos u otros lugares, como la médula ósea o el bazo. A continuación, pueden crecer en los tumores y comenzar a causar problemas en el sistema linfático o el órgano en el que están creciendo. Por ejemplo, si un linfoma comienza en la glándula tiroides, puede
15 afectar a la producción normal de hormonas tiroideas. Hay muchos tipos diferentes de linfoma no Hodgkin. Se pueden clasificar de varias maneras diferentes. Una forma es por el tipo de célula afectada. En el linfoma no Hodgkin dos tipos de linfocitos pueden ser afectados - células B y células T. Esto se clasifica como linfoma de células B o
20 linfoma de células T. La mayoría de las personas con linfoma no Hodgkin de células B tienen linfomas. Los linfomas de células T son más comunes en los adolescentes y adultos jóvenes.

Las células de linfoma de Hodgkin tienen una apariencia particular bajo el microscopio. Estas células se llaman células de Reed Sternberg.
25 Los linfomas no Hodgkin no tienen células de Reed Sternberg. Es

importante que los médicos sean capaces de distinguir la diferencia entre las células del linfoma de Hodgkin y del linfoma no Hodgkin, ya que son dos enfermedades diferentes. En el linfoma de Hodgkin, las células de los ganglios linfáticos son las que se han convertido en cancerosas.

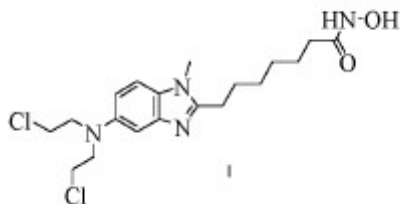
El porcentaje de la tasa de supervivencia a los 5 años en el año 2009 para los pacientes con linfoma no Hodgkin fue del 63%, mientras que la tasa de supervivencia para las personas con linfoma de Hodgkin durante el mismo período fue del 83%.

El cáncer de mama es un cáncer que se forma en los tejidos de la mama. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que comienza en el revestimiento de los conductos de la leche (tubos delgados que llevan la leche desde los lóbulos de la mama hasta el pezón). Otro tipo de cáncer de mama es el carcinoma lobulillar, que comienza en los lobulillos (glándulas mamarias) del seno. Los cánceres de mama se pueden clasificar en subgrupos de tumores bajos enclaudina, tumores de tipo basal, tumores positivos al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), tumores luminales A y tumores luminales B. El cáncer de mama invasivo es el cáncer de mama que se ha extendido desde donde se inició a los conductos de la mama o lóbulos de tejido normal circundante. El cáncer de mama se produce tanto en hombres y mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro. En 2014, se estima que habrá cerca de 233,000 casos nuevos en mujeres y 2,400 en hombres, con 40.000 muertes femeninas y poco más de 400 muertes masculinas.

Aproximadamente 15 de cada 100 mujeres con cáncer de mama tienen cáncer de mama triple negativo, es decir, son negativos a estrógeno, negativos a progesterona y son negativa HER2.

El cáncer de mama triple negativo recurrente es una condición de alta necesidad médica no cubierta, debido a su biología agresiva, rápido desarrollo de resistencia a los medicamentos y la falta de objetivos moleculares. Hasta ahora, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento estándar para el cáncer de mama triple negativo avanzado con una pobre mediana de supervivencia global. En el documento WO-A-2010/085377, se describe el compuesto de la siguiente fórmula I. Es una molécula de fusión HDACialquilante de función dual de primera clase que inhibe de forma potente la vía de HDAC.

15



20

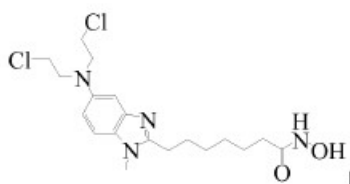
Los ensayos biológicos mostraron que el compuesto de fórmula I inhibe potentemente la enzima HDAC (HDAC1 IC₅₀ de 9 nM) y se ha demostrado que tiene una excelente actividad *in vitro* contra varias líneas celulares de mieloma.

25

Hay una necesidad de tratamientos contra el cáncer más eficaces, incluyendo el tratamiento de cáncer de mama y de los cánceres hematológicos tales como mieloma múltiple, linfoma o leucemia. En la actualidad, estas condiciones afectan a muchas personas y el pronóstico a de medio largo plazo no es bueno para muchas de estas condiciones.

Breve descripción de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación que comprende un inhibidor de receptor de tirosina
 5 quinasacalse III y un compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



10

Hemos encontrado que las combinaciones de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III tales como quizartinib son particularmente eficaces en el tratamiento de cánceres tales como
 15 cánceres hematológicos (por ejemplo leucemia, linfoma y mieloma múltiple) y cáncer de mama, de tal manera que son muy prometedores en los esfuerzos para abordar el problema de encontrar tratamientos más eficaces para el cáncer.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona
 20 una composición farmacéutica que comprende un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y una combinación de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una combinación de acuerdo con el primer aspecto de
 25 la presente invención y, opcionalmente, instrucciones para el

tratamiento de un paciente.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación, una composición o un kit de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto de la presente invención para usarse en el
5 tratamiento de cáncer, tal como cánceres hematológicos y cáncer de mama.

En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de cáncer en un paciente en necesidad del mismo que comprende administrar a dicho paciente una combinación, una
10 composición o un kit de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica del porcentaje de supervivencia *in vitro* células de leucemia mieloide agudas MT-4-11 como porcentaje del
15 control frente a log IC₅₀ para cada uno de los compuestos estudiados en los ensayos decompuestos individuales (EDO-S101 vs cisplatino y quizartinibvs cisplatino);

La figura 2 es una gráfica del porcentaje de supervivencia *in vitro* células de leucemia mieloide agudas MT-4-11 como porcentaje del
20 control frente a log IC₅₀ para cada uno de los compuestos estudiados en los ensayos decompuestos individuales y también para la combinación (EDO-S101, quizartinib y la combinación de los mismos);

La figura 3 es una gráfica del porcentaje de supervivencia *in vitro* células de leucemia mieloide agudas Molm-13 como porcentaje del
25 control frente a log IC₅₀ para cada uno de los compuestos estudiados en

los ensayos decompuestos individuales (EDO-S101 vs cisplatino y EDO-S101 vs quizartinib);y

La figura 4 es una gráfica del porcentaje de sobrevivencia *in vitro* células de leucemia mieloide agudas Molm-13 como porcentaje del control frente a log IC₅₀ para cada uno de los compuestos estudiados en los ensayos de compuestos individuales y también para la combinación (EDO-S101, quizartinib y la combinación en esto).

Descripción detallada de la invención

En la presente solicitud, se utilizan una serie de términos y frases generales, que debe interpretarse de la siguiente manera.

"Animal" incluye seres humanos, mamíferos no humanos (por ejemplo, perros, gatos, conejos, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos, ciervos y similares) y no mamíferos (por ejemplo, aves y similares).

"Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales de compuestos de la presente invención que son farmacéuticamente aceptables, como se definen anteriormente, y que poseen la deseada actividad farmacológica. Tales sales incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, o con ácidos orgánicos. Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales de adición de base que pueden formarse cuando los protones ácidos presentes son capaces de reaccionar con bases inorgánicas u orgánicas. Generalmente, tales sales, por ejemplo, se preparan haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se

prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de las sales de adición de ácido incluyen sales de adición de ácidos minerales tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, sulfamato, 5 nitrato, fosfato, y sales de adición de ácido orgánico tal como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, salicilato, tosilato, lactato, naftalenosulfonato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato. Ejemplos de las sales de adición de base incluyen sales inorgánicas tales como, por 10 ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio y amonio, y sales alcalinas orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina y sales de aminoácidos básicos.

Sorprendentemente, se ha descubierto que las combinaciones de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del 15 mismo y un inhibidor de la tirosina quinasa del receptor clase III, tales como quizartinib son particularmente eficaces en el tratamiento de cánceres, incluyendo cánceres hematológicos tales como mieloma múltiple, leucemia y linfoma, y el cáncer de mama, que son muy prometedores en los esfuerzos para abordar el problema de encontrar 20 tratamientos más eficaces para el cáncer.

En la combinación de la presente invención, la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula I puede ser preferiblemente el clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, sulfamato, nitrato, fosfato, citrato, metanosulfonato, 25 trifluoroacetato, glutamato, glucuronato, glutarato, malato, maleato,

succinato, fumarato, tartrato, tosilato, salicilato, lactato, naftalenosulfonato o etilo, y más preferentemente el acetato.

En la combinación de la presente invención, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase II es preferiblemente un inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III seleccionado de la tirosina quinasa 3 relacionada con FMS(FLT3/STK1), receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1R), receptor del factor de células madre (SCFR) y receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR).

Preferiblemente, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III es una tirosina quinasa relacionada con el inhibidor FMS 3 (FLT3) seleccionado del grupo que consiste en quizartinib, sunitinib, linifanib, foretinib, estaurosporina y tandutinib, y más preferiblemente es quizartinib.

En una combinación preferida adicional de la presente invención que comprende un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III, tal combinación puede comprender además uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Los agentes farmacéuticamente activos particularmente adecuados son agentes antitumorales que tienen un modo de acción diferente al compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III, por ejemplo, agentes alquilantes tales como nitrosoureas, etileniminas, sulfonatos de alquilo, hidrazinas y triazinas, y agentes a base de platino; alcaloides vegetales, taxanos, alcaloides de vinca; antibióticos anti-tumorales tales como cromomicinas, antraciclinas

y antibióticos diversos tales como mitomicina y bleomicina; antimetabolitos tales como antagonistas de ácido fólico, antagonistas de pirimidina, antagonistas de purina e inhibidores de adenosinadesaminasa; glucocorticoides tales como dexametasona;

5 inhibidores del proteasoma como bortezomib y carfilzomib, inhibidores de la topoisomerasa tales como inhibidores de topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, diversos antineoplásicos tales como inhibidores de la reductasade ribonucleótido, inhibidor de esteroides adrenocorticales, agentes anti-microtúbulos, y retinoides; quinasasde

10 proteínas; proteínas de choque térmico, poli-ADP. polimerasa de (adenosindifosfato)-ribosa (PARP), factores inductores de hipoxia (HIF), proteasoma, proteínas de señalización Wnt/Hedgehog/Notch, TNF-alfa, metaloproteinasas de matriz, transferasa de farnesil, vía de apoptosis, deacetilasas de histona (HDAC), acetiltransferasas de histona (HAT), y

15 metiltransferasa; terapias hormonales, agente de interrupción vascular, terapia génica, terapia del cáncer porARN, agentes quimioprotector, conjugados de anticuerpos, inmunoterapia del cáncer como Interleukin-2, vacunas contra el cáncer oanticuerpos monoclonales; y preferiblemente agentes que dañan el ADN, antimetabolitos, inhibidores

20 de la topoisomerasa, agentes antimicrotúbulos, glucocorticoides, inhibidores del proteasoma, inhibidores de EGFR, inhibidores de HER2, inhibidores de VEGFR2, inhibidores de BRAF, inhibidores de Bcr-Abl, inhibidores de PDGFR, inhibidores de ALK, inhibidores de PLK, inhibidoresde MET, agentes epigenéticos, inhibidores de

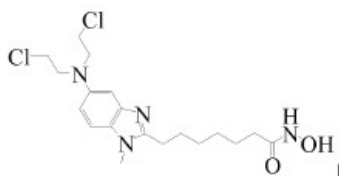
25 HSP90,inhibidores de PARP, inhibidores CHK, inhibidor de la aromatasa,

antagonista de los receptores de estrógeno, y anticuerpos dirigidos a VEGF, HER2, EGFR, CD50, CD20, CD30, CD33, etc.

En una modalidad de la combinación de la presente invención, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III de la combinación son adecuados para la administración simultánea, secuencial o independiente.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III de la combinación son adecuados para la administración simultánea.

En una modalidad de la combinación de la presente invención, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III es quizartinib y el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es



20

o la sal de acetato del mismo.

La relación molar del inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III al compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la combinación de la presente invención es típicamente de 1:2000 a 2000:1. Preferiblemente, la relación molar

25

delinhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III en el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en tal combinación es de 1:2000 a 1:100, más preferiblemente la relación molar de inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III en el compuesto de
5 fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en tal combinación es de 1:1000 a 1:500, y más preferiblemente es de 1:900 a 1:500, por ejemplo, 1:900, 1:800, 1:700, 1:600 o 1:500.

Una combinación particularmente preferida de la presente invención comprende el compuesto de fórmula I o la sal de acetato del
10 mismo y quizartinib, en donde la relación molar de quizartinib al compuesto de fórmula I o la sal de acetato del mismo en tal combinación es de 1:900 a 1:500, por ejemplo, 1:900, 1:800, 1:700, 1:600 o 1:500.

Sorprendentemente, se ha encontrado que muchas de las combinaciones que comprenden quizartinib y un compuesto de fórmula I
15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo son combinaciones sinérgicas. En otras palabras, la potencia de las combinaciones se ha medido con el software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO, EE.UU.), que se basa en el método de Chou-Talay (Chou et al., *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27-55 (1984)), que calcula un índice de
20 combinación (CI) con la siguiente interpretación:

CI $1 > 1$: efecto antagónico, CI = 1: efecto aditivo y CI < 1 efecto sinérgico.

Para muchas de las combinaciones duales de la invención que comprenden quizartinib y un compuesto de fórmula I o una sal
25 farmacéuticamente aceptable, se ha sido encontrado que CI es menor a 1,

lo que indica sinergia.

La composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención comprende un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable y una combinación de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. Las composiciones preferidas de la segunda invención incluyen los que comprenden las combinaciones preferidas de la presente invención como se ha descrito y ejemplificado anteriormente.

El diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable de la composición farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto de la presente puede ser cualquier dispersante, excipiente, adyuvante u otro material que actúe como un vehículo para los agentes activos de la combinación de la presente invención y que no interfiera con los agentes activos presentes en tal combinación. Los ejemplos de vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables típicos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin y éstos incluyen agua, solución salina, solución de dextrosa, solución de suero, solución de Ringer, polietilenglicol (por ejemplo PEG400), un agente tensoactivo (por ejemplo, Cremophor), un ciclopolisacarido (por ejemplo, hidroxipropil-3-ciclodextrina o β -ciclodextrinas de éter sulfobutilo), un polímero, un liposoma, una micela, un nanoesfera, etc.

En el tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una combinación de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención y, opcionalmente, instrucciones para el tratamiento de un paciente. Típicamente, un kit puede comprender un

compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III junto con instrucciones para el tratamiento de un paciente. Cada agente activo puede proporcionarse en un recipiente adecuado. El kit puede
5 comprender además un sistema de suministro, por ejemplo para el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III o una combinación de los mismos.

Las instrucciones pueden aconsejar la administración del inhibidor
10 de receptor de tirosina quinasa clase III y el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo simultánea, secuencial o independientemente en función de variables tales como la condición específica que está siendo tratada, el estado de esa condición, la actividad de los compuestos específicos empleados; la combinación
15 específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción de los compuestos específicos empleados; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o simultáneamente con los compuestos
20 específicos empleados; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Los kits preferidos de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención incluyen aquellos que comprenden las combinaciones preferidas de la presente invención como se ha descrito
25 y ejemplificado anteriormente.

En el cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona la combinación, la composición o kit de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto de la presente invención para usarse en el tratamiento de cáncer.

5 En el quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer en un paciente en necesidad del mismo que comprende la administración al paciente de la combinación, la composición o kit de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto de la presente invención.

10 Se ha encontrado que Las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención son muy activos tanto *in vitro* como *in vivo* contra una amplia variedad de tipos de células tumorales. La actividad antitumoral se muestra mediante estas combinaciones duales de la presente invención, y por las combinaciones en las composiciones y kits
15 de la presente invención es, en muchos casos, más que meramente aditiva, mostrando índices de combinación CI significativamente menores a 1, lo que indica sinergia para estas combinaciones. Este sorprendente hallazgo es un apoyo adicional para la eficacia particular de las combinaciones, las composiciones y kits de la presente invención
20 en el tratamiento del cáncer.

Ejemplos de cánceres que se pueden tratar con Las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención incluyen los cánceres hematológicos tales como mieloma múltiple, linfoma y leucemia, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer
25 colorrectal, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de páncreas,

cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de tracto biliar, cáncer de esófago, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de riñón, melanoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, sarcoma, mesotelioma, timoma, síndrome de mielodisplasia, glioblastoma y enfermedades mieloproliferativas. En particular, Las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención son eficaces contra cánceres hematológicos tales como mieloma múltiple, linfoma y leucemia, y cáncer de mama.

10 En una modalidad de la combinación, la composición o kit para usarse en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención o el método de tratamiento de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención, el cáncer se selecciona de un cáncer hematológico y el cáncer de mama.

15 Cuando la combinación, la composición o el kit de la presente invención se usa en el tratamiento de un cáncer hematológico, este preferiblemente se puede seleccionar de mieloma múltiple (por ejemplo, mieloma activo, plasmocitoma, mieloma de cadena ligera o el mieloma no secretor), linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin) y leucemia [leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML, incluyendo leucemia mieloblástica, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda y leucemia megacariotica aguda, todas las formas son tratables en todas las fases, incluyendo fases de recaída y

20
25

refractarias), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia de células peludas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande o leucemia linfoblástica aguda de células T]. Se prefiere particularmente utilizar la combinación en el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML).

Cuando la combinación, la composición o kit de la presente invención va a usarse en el tratamiento de cáncer de mama, el cáncer de mama típicamente puede seleccionarse de tumores bajos en claudina, tumores basales, tumores positivos al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), tumores luminales A y tumores luminales B, y es preferiblemente un cáncer de mama triple negativo.

En una modalidad preferida de la combinación, la composición o kit que va a usarse en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención y el método de tratamiento de cáncer de acuerdo con la presente invención, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III y el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de manera simultánea, secuencial o independiente. Más preferiblemente, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III y el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran simultáneamente.

En la combinación, la composición o el kit para usarse en el tratamiento del cáncer y el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con la presente invención, el compuesto de la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra típicamente al

paciente en necesidad del mismo en un intervalo de dosificación de 10 a 100 mg/kg de peso corporal del paciente, y preferiblemente en un intervalo de dosificación de 40 a 80 mg/kg de peso. Típicamente, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III se administra en un
5 intervalo de dosificación de 0.01 a 1 mg/kg de peso corporal del paciente, y preferiblemente, se administra en un intervalo de dosificación de 0.1 a 0.25 mg/kg de peso corporal del paciente.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación, una composición o un kit de acuerdo con la presente invención es una
10 cantidad de La combinación, la composición o el kit que confiere un efecto terapéutico de acuerdo con los aspectos cuarto y quinto de la presente invención en el sujeto tratado, con una razonable relación riesgo/beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o
15 marcador) o subjetivo (es decir, sujeto a una indicación de la sensación de un efecto). Una cantidad eficaz de la combinación, la composición o el kit de acuerdo con la presente invención se cree que es una en la que el compuesto de fórmula I o una sal del mismo, se incluye en la combinación en un intervalo de dosificación de 10 a 100 mg/kg de peso
20 corporal del paciente (por ejemplo 40 a 80 mg/kg de peso corporal tal como 40, 50, 60, 70 o 80 mg/kg de peso corporal) y se administra el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III en un intervalo de dosificación de 0.1 a 0.25 mg/kg de peso del paciente (por ejemplo, 0.1, 0.15, 0.2 o 0.25 mg/kg corporal del paciente peso).

25 Las dosis eficaces variarán dependiendo de la vía de

administración, así como la posibilidad de uso conjunto con otros agentes activos. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de Las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o simultáneamente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

La presente invención también se dirige al uso de una combinación, una composición o un kit de acuerdo con el primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo para el tratamiento de un cáncer hematológico o cáncer de mama.

Los ejemplos adecuados de la forma de administración de la combinación, la composición o el kit de la presente invención incluyen, sin limitación oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Preferiblemente, Las combinaciones, las

composiciones y los kits se administran parenteralmente. Combinaciones, composiciones y kits de la invención pueden formularse de manera que permita que una combinación o composición de la presente invención estén biodisponibles después de la administración de

5 La combinación, la composición o el kit a un animal, preferiblemente humano. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, una tableta puede ser una sola unidad de dosificación, y un contenedor de una combinación o composición de la presente invención en forma de aerosol puede

10 contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Preferiblemente, las combinaciones de la presente invención se proporcionan en forma de kits. Típicamente, un kit incluye un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III. En ciertas

15 modalidades, un kit puede incluir uno o más sistemas de suministro, por ejemplo, el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una combinación de los mismos, y las instrucciones para el uso del kit (por ejemplo, instrucciones para tratar a un sujeto). Estas

20 direcciones/instrucciones pueden aconsejar la administración del inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III y el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de la combinación simultánea, secuencial o independientemente de acuerdo con variables tales como la condición específica que se trate, el estado de esa

25 condición, la actividad de los compuestos específicos empleados; la

combinación específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción de los compuestos específicos empleados; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados ya sea
5 en combinación o simultáneamente con los compuestos específicos empleados; y aquellos factores que son bien conocidos en las técnicas médicas.

El diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser de partículas, de modo que las composiciones son, por ejemplo, pueden ser
10 en forma de tabletas o de polvo. El o los vehículos puede ser líquidos, las combinaciones, composiciones o kits son por ejemplo, un jarabe oral o líquido inyectable. Además, el o los vehículos pueden ser gaseosos, a fin de proporcionar una composición de aerosol útil en, por ejemplo, la administración por inhalación. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser
15 líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden
20 utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una modalidad, cuando se administra a un animal, la combinación, la composición o el kit de la presente invención y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un portador preferido cuando la combinación, la composición o el kit de la
25 presente invención se administra por vía intravenosa. Las soluciones

salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadoras del pH.

Cuando se destinan a la administración oral, la combinación, la composición o el kit pueden estar en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y gel se incluyen dentro de las formas consideradas aquí como sólidas o líquidas.

Como una composición sólida para la administración oral, la combinación, la composición o kit se pueden formular en un polvo, gránulo, tableta, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o forma similar. Tal composición sólida contiene típicamente uno o más diluyentes inertes, ya sea como una únicatableta que contiene todos los agentes activos o como un número de composiciones sólidas independientes, que comprende cada uno un único agente activo de la combinación de la presente invención (en el caso del kit). Además, uno o más de los siguientes pueden estar presentes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes

disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio; lubricantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes endulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja; y un agente colorante.

Cuando la combinación, la composición o el kit estén en forma de una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La combinación, la composición o el kit pueden estar en la forma de un líquido, por ejemplo, elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para la administración oral o para la aplicación por inyección. Cuando se destinan a la administración oral, una combinación, una composición o un kit puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una combinación o composición para administración por inyección, uno o más de un tensoactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico también pueden ser incluidos.

La vía de administración preferida es la administración parenteral, incluyendo, pero no limitado a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, intranasal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intravaginal o transdérmica. El modo preferido de administración se deja a la discreción del médico, y

dependerá en parte de la sitio de la afección médica (tal como el sitio del cáncer). En una modalidad más preferida, las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención se administran por vía intravenosa.

5 Las combinaciones y composiciones líquidas de la invención, ya sean soluciones, suspensiones u otras formas similares, pueden también incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites
10 fijados tales como mono o diglicéridos sintéticos, polietilenglicoles, glicerina, u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabeno de metilo; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una combinación o composición parenteral se puede encerrar en una ampolla, una jeringa
15 desechable o un frasco para múltiples dosis, hechos de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido.

Para la administración (por ejemplo, intravenosa) la combinación o composición puede comprender típicamente el compuesto de fórmula I o una sal del mismo en un intervalo de dosificación de 10 a 100 mg/ kg de
20 peso corporal del paciente y preferiblemente de 40 a 80 mg/kg de peso corporal del paciente. Típicamente, la combinación o composición pueden comprender el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III en un intervalo de dosificación de 0.1 a 1 mg/kg de peso corporal del paciente, y preferiblemente de 0.1 a 0.25 mg/kg peso corporal del
25 paciente.

Las combinaciones de la invención se pueden formular de tal manera que el inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III y el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de la combinación se adapta para la administración de manera simultánea, secuencial o independiente. Preferiblemente, se administran simultáneamente.

La combinación, la composición o el kit de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneas.

En modalidades específicas, puede ser deseable administrar una o más combinaciones, composiciones o kits de la presente invención o combinaciones, composiciones o kits localmente al área en necesidad de tratamiento. En una modalidad, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico.

La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización, o por medio de perfusión en un fluorocarbono o surfactante pulmonar sintético. En ciertas modalidades, la combinación, la composición o el kit de la presente invención o las composiciones se pueden formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos.

La presente combinación, composición o kit pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, gránulos,

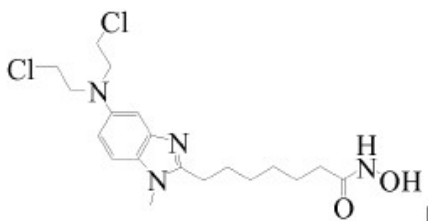
cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para usarse. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

Las combinaciones farmacéuticas, las composiciones o los kits se pueden preparar usando metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición destinada a ser administrada por inyección se puede preparar mediante la combinación de una combinación o composición de la presente invención con agua a fin de formar una solución. Un agente tensoactivo puede ser añadido para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea.

Las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención son particularmente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se ha demostrado que las combinaciones, las composiciones y los kits de la presente invención son muy activos tanto *in vitro* como *in vivo* contra una amplia variedad de tipos de células tumorales, lo que los hace particularmente interesantes para el desarrollo para usarse en el tratamiento del cáncer, por ejemplo cáncer hematológico y cáncer de mama.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, el compuesto que tiene la siguiente fórmula I se conoce como EDO-S101:



5

Ejemplo 1: Combinaciones *in Vitro* de EDO-S101 –línea celular de leucemia mieloide aguda MV-4-11

La línea celular de leucemia mieloide aguda MV-4-11 (obtenida de la ATCC) se cultivó en medio suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Los medios de cultivo se adquirieron de GIBCO, EE.UU.. Las células se sembraron en microplacas de poliestireno tratado con TC planas de 96 pocillos de fondo transparente negro (Cat # 3603, Corning®).

Los compuestos estudiados fueron EDO-S101 y quizartinib, así como el cisplatino de control de referencia. El equipo utilizado fue el EnvisionMultiLabelReader, PerkinElmer (EE.UU.). Incubadora con camisa de CO₂ agua, Thermo (EE.UU.). Microscopio inverso, Chongguang XDS-1 B, Chongqing Guangdian Corp. (Chongqing, República Popular China).

Las células se colectaron, respectivamente, durante el período de crecimiento logarítmico y se contaron con un hemocitómetro. La viabilidad de las células es más del 98% por exclusión de azul de tripano.

Para el ensayo de un solo fármaco, las concentraciones de células se ajustaron a 4.44x10⁴ células/ml con el medio suplementado con 10%

25

FBS. Suspensiones de células de 90µl se agregaron a placas de 96 pocillos, de manera que la densidad celular final fue 4×10^3 células/pocillo. Se determinó la densidad celular apropiada y se ajustó de acuerdo con los resultados de nuestra primera prueba.

5 El día siguiente, 10µl (10,) de solución de fármaco se preparó y se dispensó en cada pocillo (por triplicado para cada concentración de fármaco). Después de la incubación de 72 h, 100µl de reactivo CellTiter-Glo® se agregaron a cada pocillo. El contenido se mezcló durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. La placa se
10 dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. Por último, la luminiscencia se registró usando un lector de etiquetas de múltiples Envision.

Para las pruebas de combinación de dos fármacos, las concentraciones de células se ajustaron a 5.00×10^4 ml con el medio
15 suplementado con 10% FBS. Suspensiones de células 80µl se agregaron a placas de 96 pocillos, de manera que las densidades celulares finales fueron 4×10^3 células/pocillo. Se determinó la densidad celular apropiada y se ajustó de acuerdo con los resultados de nuestra primera prueba.

El día siguiente, se prepararon 10µl (10,) de cada solución de
20 fármaco y se dosificó en cada pocillo de forma simultánea (por triplicado para cada concentración). Después de la incubación durante 72 h, 100 µl De reactivo CellTiter-Glo® se agregó a cada pocillo. El contenido se mezcló durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. La placa se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10
25 minutos para estabilizar la señal luminiscente. A continuación, la

luminiscencia se registró utilizando EnvisionMultiLabel Reader.

Los datos se muestran gráficamente utilizando GraphPadPrism 5.0. Para el cálculo de IC₅₀, una curva de respuesta a la dosis se ajustó utilizando el modelo de regresión no lineal con una respuesta a la dosis sigmoideal. La fórmula de la tasa de sobrevivencia se muestra a continuación, y el IC₅₀ se produce automáticamente mediante GraphPadPrism 5.0.

$$\text{Tasa de sobrevivencia(\%)} = (\text{Lum}_{\text{artículo de prueba}} - \text{Lum}_{\text{medio de control}}) / (\text{Lum}_{\text{sin tratamiento}} - \text{Lum}_{\text{medio de control}}) \times 100\%.$$

Las interacciones del compuesto se calcularon mediante análisis de efecto de múltiples fármacos y se realizan según el principio ecuación mediana con software Calculusyn de la fracción afectada media en cada concentración relación fármaco de cada fármaco de acuerdo con la metodología descrita por Chou y Talalay (Chou et al., *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27-55 (1984)), que calcula un índice de combinación (CI) con la siguiente interpretación:

CI > 1: efecto antagonista, CI = 1: efecto aditivo y CI < 1 efecto sinérgico.

El CI se calcula a partir de la fracción afectada media en cada proporción de concentración de fármaco de cada fármaco.

En las gráficas el porcentaje de células sobrevivientes vs la concentración logarítmica de los fármacos de prueba en la figura 1 (pruebas de un solo fármaco), los valores IC₅₀ para el control de cisplatino y EDO-S101 fueron 0.9607 y 0.6675, respectivamente, mientras que los de quizartinib y cisplatino fueron 0.0008043 y 1.256

respectivamente.

La figura 2, muestra una representación gráfica del porcentaje de las células supervivientes vs $IC_{50} \log$ a prueba de los fármacos estudiados muestra una excelente actividad combinada de la combinación De EDO-S101 y quizartinib. Esto se confirma en los valores de CI en la siguiente tabla 1:

Fármaco	Proporción de combinación	Valores C1 en			Valores de DRI a		
		ED50	ED75	ED90	ED50	ED75	ED90
EDO-S101+ Quizartinib	1:0.00120494	1.07686	0.89385	0.76789	1.263	1.368	1.482
					3.511	6.146	10.760

Tabla 1

Como puede verse a partir de los valores de CI, la combinación de EDO-S101 y quizartinib muestra sinergia en su actividad contra la línea celular de leucemia mieloide aguda MV-4-11.

Ejemplo 2: Combinaciones de EDO-S101 *in Vitro* - línea celular de leucemia mieloide aguda MOLM-13

La línea celular de leucemia mieloide aguda MOLM-13 (obtenido de la ATCC) se cultivaron en medio suplementado con 10% FBS a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. Los medios de cultivo se adquirió de GIBCO, EE.UU.. Las células se sembraron en microplacas de poliestireno tratado con TC planas de 96 pocillos de fondo transparente negro (Cat # 3603, Corning®).

Los compuestos estudiados fueron EDO-S101 y quizartinib, así

como el cisplatino de control de referencia. El equipo utilizado fue el LabelEnvisionMulti Reader, PerkinElmer (EE.UU.). Incubadora con camisa de CO₂ agua, Thermo (EE.UU.). Microscopio inverso, Chongguang XDS-1 B, Chongqing Guangdian Corp. (Chongqing, República Popular China).

Las células se colectaron, respectivamente, durante el período de crecimiento logarítmico y se contaron con un hemocitómetro. La viabilidad de las células fue mayor al 98% por exclusión de azul de tripano.

Para el ensayo de un solo fármaco, las concentraciones de células se ajustaron a 4.44×10^4 células/ml con el medio suplementado con 10% FBS. Suspensiones de células de 90µl se agregaron a placas de 96 pocillos, de manera que la densidad celular final fue de 4×10^3 células/pocillo. Se determinó la densidad celular apropiada y se ajustó de acuerdo con los resultados de nuestra primera prueba.

El día siguiente, 10µl (10,) de solución de fármaco se preparó y se dispensó en cada pocillo (por triplicado para cada concentración de fármaco). Después de la incubación de 72 h, 100µl de reactivo CellTiter-Glo® se agregaron a cada pocillo. El contenido se mezcló durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. La placa se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. Por último, la luminiscencia se registró usando un lector de etiquetas de múltiples Envision.

Para las pruebas de combinación de dos fármacos, las concentraciones de células se ajustaron a 5.00×10^4 ml con el medio

suplementado con 10% FBS. Suspensiones de células 80 µl se agregaron a placas de 96 pocillos, de manera que las densidades celulares finales fueron 4×10^3 células/pocillo. Se determinó la densidad celular apropiada y se ajustó de acuerdo con los resultados de nuestra primera prueba.

El día siguiente, se prepararon 10µl (10,) de cada solución de fármaco y se dosifico en cada pocillo de forma simultánea (por triplicado para cada concentración). Después de la incubación durante 72 h, 100 µl De reactivo CellTiter-Glo® se agregó a cada pocillo. El contenido se mezcló durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. La placa se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. A continuación, la luminiscencia se registró utilizando EnvisionMultiLabel Reader.

Los datos se muestran gráficamente utilizando GraphPadPrism 5.0. Para el cálculo de IC_{50} , una curva de respuesta a la dosis se ajustó utilizando el modelo de regresión no lineal con una respuesta a la dosis sigmoidal. La fórmula de la tasa de sobrevivencia se muestra a continuación, y el IC_{50} se produce automáticamente mediante GraphPadPrism 5.0.

$$\text{Tasa de sobrevivencia (\%)} = \frac{(\text{Lum}_{\text{articulo de prueba}} - \text{Lum}_{\text{medio de control}})}{(\text{Lum}_{\text{sin tratamiento}} - \text{Lum}_{\text{medio de control}})} \times 100\%.$$

Las interacciones del compuesto se calcularon mediante análisis de efecto de múltiples fármacos y se realizan según el principio ecuación mediana con software Calculusyn de la fracción afectada media en cada concentración relación fármaco de cada fármaco de acuerdo

con la metodología descrita por Chou y Talalay, que calcula un índice de combinación (CI) con la siguiente interpretación:

CI > 1: efecto antagonista, CI = 1: efecto aditivo y CI < 1 efecto sinérgico.

- 5 El CI se calcula a partir de la fracción afectada media en cada proporción de concentración de fármaco de cada fármaco.

En las gráficas el porcentaje de células sobrevivientes vs la concentración logarítmica de los fármacos de prueba en la figura 1 (pruebas de un solo fármaco), los valores IC₅₀ para el control de
10 cisplatino, EDO-S101 y quizartinib fueron de 1.151 y 0.7079 y 0.002112 respectivamente, mientras que los de EDO-S101 y quizartinib usando diferentes dosis (con diluciones en serie 1:2) fueron 1.720 y 0.004546 respectivamente.

La figura 4, muestra una representación gráfica del porcentaje de
15 las células supervivientes vs IC₅₀ log a prueba de los fármacos estudiados muestra una excelente actividad combinada de la combinación De EDO-S101 y quizartinib. Esto se confirma en los valores de CI en la siguiente tabla 1:

20

Fármaco	Proporción de combinación	Valores CI en			Valores de DRI a		
		ED50	ED75	ED90	ED50	ED75	ED90
EDO-S101+ Quizartinib	1:0.00264302	0.689	0.480	0.338	4.768 2.087	5.925 3.215	8.534 6.645

Como puede verse a partir de los valores de CI, la combinación de EDO-S101 y quizartinib muestra sinergia en su actividad contra la línea celular de leucemia mieloide aguda MV-4-11.

En conclusión, se puede observar que el compuesto de LA fórmula I (EDO-S101) muestran excelente actividad en combinación con inhibidores de receptor de tirosina quinasa clase III tales como quizartinib actuando tanto *in vitro* como *in vivo* contra la leucemia mieloide aguda. Además, se puede observar que la actividad de estas combinaciones es sorprendentemente sinérgica. Es de esperar que estas combinaciones serán activas contra una amplia gama de cánceres hematológicos, no sólo la leucemia, sino otras condiciones hematológicas como el linfoma y el mieloma múltiple. También creemos que estas combinaciones son propensas a ser activas frente a otros tipos de cáncer como el cáncer de mama.

Como resultado, es de esperar que las combinaciones del compuesto de fórmula I de la presente invención con un inhibidor de receptor de tirosina quinasa clase III serán útiles en el tratamiento del cáncer, los cánceres hematológicos en particular y el cáncer de mama.