

**COMBINACIÓN DE UN INHIBIDOR DE MCL-1 Y UN COMPUESTO TAXANO,
USOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE ÉSTA**

LES LABORATOIRES SERVIER

35, rue de Verdun

92284 SURESNES Cedex

Francia

NOVARTIS AG

Lichtstrasse 35

4056 Basilea

Suiza

INVENTORES: Dale PORTER

Ensar HALILOVIC

Ana Leticia MARAGNO

Maïa CHANRION

Olivier GENESTE

Delphine MERINO

James WHITTLE

François VAILLANT

Jane VISVADER

Geoffrey LINDEMAN

Guillaume LESSENE

Elisabetta MARANGONI

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una combinación de un inhibidor de MCL-1 y un compuesto taxano. La invención también se refiere al uso de dicha combinación en el tratamiento del cáncer, en particular de los cánceres de mama, pulmón, ovario, vejiga y próstata, más particularmente cánceres de mama y pulmón. También se proporcionan formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración de dichas combinaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer se caracteriza por proliferación celular incontrolada. Los agentes antimitóticos y agentes antimicrotúbulos se han explorado para la terapia del cáncer debido a su importante efecto en la división celular. La inhibición de la maquinaria mitótica resulta en un conjunto diverso de resultados, dando lugar principalmente a la parada del ciclo celular y muerte celular. Los agentes antimicrotúbulos, tales como taxanos, están siendo usados actualmente en el entorno clínico. Por ejemplo, el paclitaxel y docetaxel tienen un espectro similar de actividad clínica incluyendo cánceres de ovario, pulmón, mama, vejiga, y próstata. Los taxanos son agentes anti-mitóticos que se unen a la tubulina e inhiben la despolimerización de los microtúbulos interrumpiendo de esta forma el equilibrio normal implicado en el ensamblaje y desconstrucción de microtúbulos y, por lo tanto, alterando el funcionamiento de los microtúbulos. Los microtúbulos son esenciales para la división celular y las células expuestas a taxanos pueden no dividirse. La parada del ciclo celular después de tratamiento con taxanos puede resultar eventualmente en la muerte celular debido a una mitosis no exitosa. A pesar de los avances en la terapia anticáncer, existe desde hace mucho tiempo una necesidad de terapias más efectivas con toxicidades limitadas. Ciertamente, las toxicidades asociadas con paclitaxel y docetaxel incluyen neutropenia como la toxicidad limitante de la dosis principal, junto con neuropatía periférica significativa. De hecho, las reducciones de las dosis son frecuentes en pacientes pretratados intensamente para mitigar la gravedad de estas toxicidades. Por encima de todo esto, el desarrollo de resistencia a taxanos también limita su uso en la clínica.

La apoptosis es una ruta de muerte celular altamente regulada que se inicia por varios estímulos citotóxicos, incluyendo estrés oncogénico y agentes quimioterapéuticos. Se ha mostrado que la evasión de la apoptosis es una característica distintiva del cáncer y que la eficacia de muchos agentes quimioterapéuticos depende de la activación de la ruta mitocondrial intrínseca. Tres subgrupos distintos de proteínas de la familia BCL-2 controlan la ruta de apoptosis intrínseca: (i) las proteínas sólo BH3 pro-apoptóticas (la homología 3 de Bcl-2); (ii) los miembros pro-supervivencia tal como BCL-2 en sí misma, BCL-xL, BCL-W, MCL-1 y BCL-2A1; y (iii) las proteínas efectoras pro-apoptóticas BAX y BAK (Czabotar et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, 15, 49-63). La sobreexpresión de los miembros anti-apoptóticos de la familia BCL-2 se observa en muchos cánceres, (Adams y Cory, *Oncogene* 2007, 26, 1324-1337) y la inhibición farmacológica de las proteínas anti-apoptóticas por fármacos miméticos BH3 tal como ABT-199 (venetoclax), ABT-263 (navitoclax) y S63845 ha surgido como una estrategia terapéutica para inducir la apoptosis y causar la regresión tumoral en el cáncer (Zhang et al., *Drug Resist. Updat.* 2007, 10, 207-217; Kotschy et al., *Nature* 2016, 538, 477-482). No obstante, se han observado mecanismos de resistencia a los miméticos BH3 (Choudhary et al., *Cell Death and Disease* 2015, 6, e1593) y el uso de terapias de combinación podría mejorar la eficacia y retardar o incluso suprimir el desarrollo de la resistencia.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y puede estratificarse en al menos cinco subgrupos principales sobre la base del perfilado de la expresión génica: Luminal A, Luminal B (positivo a estrógenos, ER⁺), HER2-amplificado, semejante a basal (predominantemente cáncer de mama triple negativo o TNBC) y semejante a normal (Curtis et al., *Nature* 2012, 486, 346-352; Perou et al., *Nature* 2000, 406, 747-752). Estos subtipos predicen generalmente el comportamiento clínico respecto a la respuesta y resistencia a terapia, patrones de metástasis, y supervivencia global. Múltiples mecanismos contribuyen a la progresión tumoral y resistencia a terapia del cáncer, incluyendo la evasión de la muerte celular debido a una desregulación del equilibrio entre miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia BCL2 (Merino et al., *Oncogene* 2016, 35, 1877-1887; Beroukim et al., *Nature* 2010, 463, 899-905; Wertz et al., *Nature* 2011, 471, 110-114; Goodwin et al., *Cell Death Differ.* 2015). En el subgrupo de cáncer de mama triple negativo, la enfermedad residual después de terapia neo-adyuvante está asociada con

mayor riesgo de recurrencia metastásica comparado con pacientes que consiguen una respuesta patológica completa (Liedtke et al., *J. Clin. Oncol.* 2008, 26(8), 1275-1281). Aproximadamente el 70% de los pacientes con TNBC no consiguen una respuesta completa después de quimioterapia neo-adyuvante (tal como paclitaxel o docetaxel) y padecen un resultado dramáticamente peor, con una mayor probabilidad de recidiva metastásica y una supervivencia global a 3 años de sólo el 60-70%.

El cáncer de pulmón se clasifica en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), y carcinoide. Aproximadamente el 80% de todos los cánceres de pulmón corresponden a NSCLC, que puede clasificarse adicionalmente en adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, y carcinoma de células grandes. El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte relacionada con cáncer en hombres y la segunda más común en mujeres después del cáncer de mama. Aunque la terapia del cáncer de pulmón ha evolucionado significativamente con la aparición de la terapia dirigida, todavía existe una fuerte necesidad de desarrollar nuevas terapias con el fin de mejorar la eficacia del tratamiento, reducir los efectos secundarios y evitar la aparición de resistencia (Rothschild *Cancers* 2015, 7(2), 930-949).

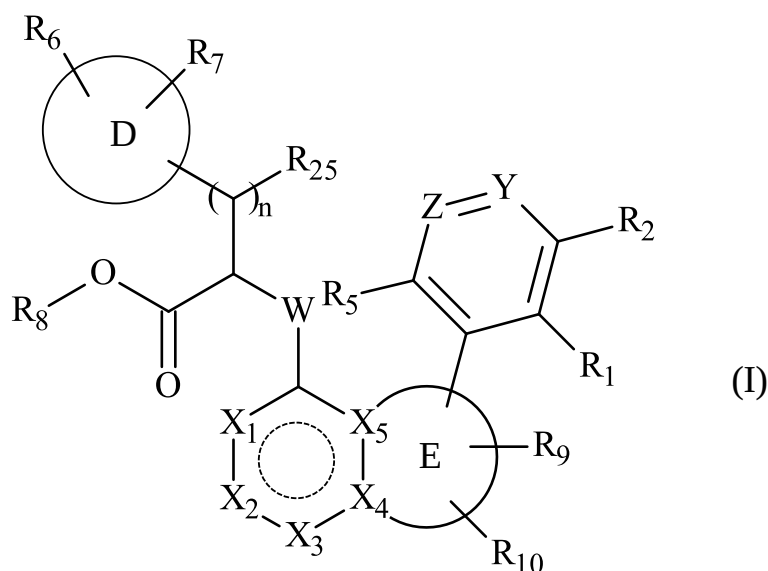
La presente invención proporciona una nueva combinación de un inhibidor de MCL-1 y un compuesto taxano. Los resultados muestran que la asociación de moléculas pequeñas potentes dirigidas a MCL-1 con agentes antimicrotúbulos es altamente sinérgica en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón (Figuras 1 a 7; Tablas 1 y 4). También mostramos que la combinación de la función de interrupción de microtúbulos y direccionamiento a MCL-1 *in vivo* es eficaz a dosis toleradas en modelos de cáncer de mama PDX (Xenoinjerto Derivado de Paciente) (Figuras 8 y 9) y a diferentes dosis en ratas hembras desnudas que portan xenoinjerto MDA-MB-231, un modelo de cáncer de mama triple negativo (Figuras 10 a 14). La combinación positiva también se observó en diferentes modelos de PDX de TNBC usando diferentes esquemas de administración (Figura 15). El efecto sinérgico del direccionamiento a MCL-1 e interrupción de la función de microtúbulos *in vitro* e *in vivo* a dosis toleradas se ha demostrado mediante la combinación de inhibidores que son moléculas pequeñas potentes. Finalmente, el análisis del tumor residual después de tratamiento neo-adyuvante es un campo principal y

subexplorado para estudiar la quimiorresistencia y, así, realizamos experimentos en modelos de PDX resistentes a quimioterapia que muestran que la combinación de un inhibidor de MCL-1 y un compuesto taxano es eficiente (Ejemplo 9).

RESUMEN DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una combinación que comprende:

(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I):



en la que:

- ◆ D representa un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,
- ◆ E representa un anillo furilo, tienilo o pirrolilo,
- ◆ X₁, X₃, X₄ y X₅ independientemente uno de otro representan un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno,
- ◆ X₂ representa un grupo C-R₂₆ o un átomo de nitrógeno,
- ◆  significa que el anillo es aromático,
- ◆ Y representa un átomo de nitrógeno o un grupo C-R₃,
- ◆ Z representa un átomo de nitrógeno o un grupo C-R₄,
- ◆ R₁ representa un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado,

un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆), un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -Cy₈, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁',
 5 -O-alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁,
 -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁',
 -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆),

♦ R₂, R₃, R₄ y R₅ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un
 10 grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆), un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro , -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁',
 -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁,
 15 -O-alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁,
 -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁',
 -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆),
 o los sustituyentes de la pareja (R₁, R₂), (R₂, R₃), (R₃, R₄), (R₄, R₅) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no
 20 aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con de 1 a 2 grupos seleccionados de halógeno, alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ u oxo,

♦ R₆ y R₇ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un
 25 grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁,
 -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁,
 30 -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁',

-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁',
-SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆),

o los sustituyentes de la pareja (R₆, R₇), cuando se injertan en dos átomos de carbono adyacentes, forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo seleccionado de un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ o un oxo,

- ◆ W representa un grupo -CH₂-, un grupo -NH- o un átomo de oxígeno,
- ◆ R₈ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₈) lineal o ramificado, un grupo -CHR_aR_b, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo arilalquilo(C₁-C₆), o un grupo heteroarilalquilo(C₁-C₆),
- ◆ R₉ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, -Cy₂, -alquilo(C₁-C₆)-Cy₂, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₂, -alquino(C₂-C₆)-Cy₂, -Cy₂-Cy₃, -alquino(C₂-C₆)-O-Cy₂, -Cy₂-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₃, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R₁₄, o -C(O)-NR₁₄R₁₄',

- ◆ R₁₀ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo arilalquilo(C₁-C₆), un grupo cicloalquilalquilo(C₁-C₆), un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, o -alquilo(C₁-C₆)-O-Cy₄,

o los sustituyentes de la pareja (R₉, R₁₀), cuando se injertan en dos átomos de carbono adyacentes, forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno,

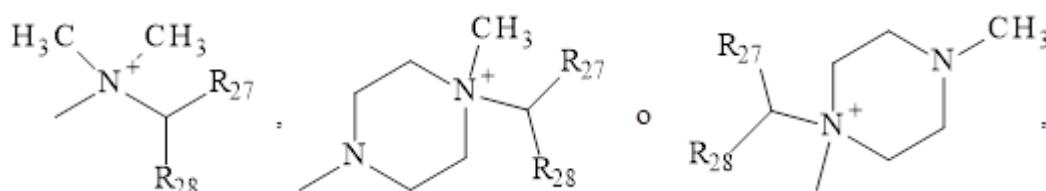
- ◆ R₁₁ y R₁₁' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, o -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁,

o los sustituyentes de la pareja (R₁₁, R₁₁') forman junto con el átomo de nitrógeno

al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con de 1 a 2 grupos que representan un

átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes, pueden estar deuterados,

♦ R₁₂ representa -Cy₅, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆,
 -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆,
 -Cy₅-Cy₆-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₇, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₉,
 -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-Cy₉, -NH-C(O)-NH-R₁₁,
 -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁-alquilo(C₀-C₆)-Cy₉, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁R₁₁', -OR₁₁,
 -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-OR₁₁, -SO₂-R₁₁, -C(O)-OR₁₁,



siendo posible para el amonio así definido existir como una forma zwitteriónica o tener un contraión aniónico monovalente,

♦ R₁₃, R₁₃', R₁₄ y R₁₄' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente,

♦ R_a representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado,

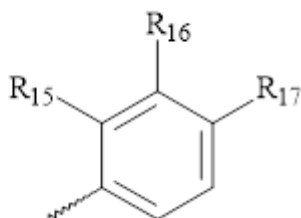
♦ R_b representa un grupo -O-C(O)-O-R_c, un grupo -O-C(O)-NR_cR_c', o un grupo -O-P(O)(OR_c)₂,

♦ R_c y R_c' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₈) lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆), o un grupo alcóxicarbonilo(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆),

o los sustituyentes de la pareja (R_c, R_c') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o

ramificado,

- ♦ Cy₁, Cy₂, Cy₃, Cy₄, Cy₅, Cy₆, Cy₇, Cy₈ y Cy₁₀ independientemente uno de otro, representan un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,



- ♦ Cy₉ representa

o Cy₉ representa un grupo heteroarilo que está sustituido con un grupo seleccionado de -O-P(O)(OR₂₀)₂; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; hidroxil; hidroxialquilo(C₁-C₆); -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo; o -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ,

- ♦ R₁₅ representa un átomo de hidrógeno; un grupo -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; un grupo alcoxi(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado; un grupo -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ; o un grupo -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo,

- ♦ R₁₆ representa un átomo de hidrógeno; un grupo hidroxil; un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆); un grupo -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo; un grupo (CH₂)_r-U-V-O-P(O)(OR₂₀)₂; un grupo -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; un grupo -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; un grupo -(CH₂)_p-O-C(O)-NR₂₂R₂₃; o un grupo -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ,

- ♦ R₁₇ representa un átomo de hidrógeno; un grupo -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; un grupo -O-P(O)(OR₂₀)₂; un grupo -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; un grupo hidroxil; un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆); un grupo -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo; un grupo -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ; o un ácido aldónico,

- ♦ M⁺ representa un catión monovalente farmacéuticamente aceptable,

- ♦ U representa un enlace o un átomo de oxígeno,

- ♦ V representa un grupo -(CH₂)_s- o un grupo -C(O)-,

- ♦ R₁₈ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alcoxi(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆),

- ♦ R₁₉ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆),

- ♦ R₂₀ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o

ramificado,

- ♦ R_{21} y R_{21}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado, o un grupo hidroxialquilo(C_1-C_6), o los sustituyentes de la pareja (R_{21} , R_{21}') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,
- ♦ R_{22} representa un grupo alcoxi(C_1-C_6)alquilo(C_1-C_6), un grupo $-(CH_2)_p-NR_{24}R_{24}'$, o un grupo $-(CH_2)_p-O-(CHR_{18}-CHR_{19}-O)_q-R_{20}$,
- ♦ R_{23} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alcoxi(C_1-C_6)alquilo(C_1-C_6), o los sustituyentes de la pareja (R_{22} , R_{23}) forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 18 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo heterocicloalquilo,
- ♦ R_{24} y R_{24}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado, o los sustituyentes de la pareja (R_{24} , R_{24}') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,
- ♦ R_{25} representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo hidroxialquilo(C_1-C_6),
- ♦ R_{26} representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado, o un grupo ciano,
- ♦ R_{27} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o

ramificado,

- ♦ R_{28} representa un grupo $-O-P(O)(O^-)(O^-)$, un grupo $-O-P(O)(O^-)(OR_{30})$, un grupo $-O-P(O)(OR_{30})(OR_{30}')$, un grupo $-O-SO_2-O^-$, un grupo $-O-SO_2-OR_{30}$, $-Cy_{10}$, un grupo $-O-C(O)-R_{29}$, un grupo $-O-C(O)-OR_{29}$ o un grupo $-O-C(O)-NR_{29}R_{29}'$;
- ♦ R_{29} y R_{29}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo aminoalquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,
- ♦ R_{30} y R_{30}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo arilalquilo(C_1-C_6),
- ♦ n es un número entero igual a 0 ó 1,
- ♦ p es un número entero igual a 0, 1 ó 2,
- ♦ q es un número entero igual a 1, 2, 3 ó 4,
- ♦ r y s son independientemente un número entero igual a 0 ó 1,

entendiéndose que:

- "arilo" significa un grupo fenilo, naftilo, bifenilo, indanilo o indenilo,
- "heteroarilo" significa cualquier grupo mono o bicíclico compuesto por de 5 a 10 miembros en el anillo, que tiene al menos un resto aromático y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno,
- "cicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo,
- "heterocicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo, y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, que puede incluir sistemas de anillos fusionados, con puente o espiro,

siendo posible para los grupos arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo así definidos y el alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, estar sustituidos con de 1 a 4 grupos seleccionados de alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquenilo(C_2-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquinilo(C_2-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, alcoxi(C_1-C_6) lineal o ramificado sustituido

opcionalmente, alquilo(C₁-C₆)-S- sustituido opcionalmente, hidroxilo, oxo (o *N*-óxido cuando sea apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR', -O-C(O)-R', -C(O)-NR'R'', -NR'R'', -(C=NR')-OR'', polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, trifluorometoxi, o halógeno, entendiéndose que R' y R'' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes precedentes, pueden estar deuterados,

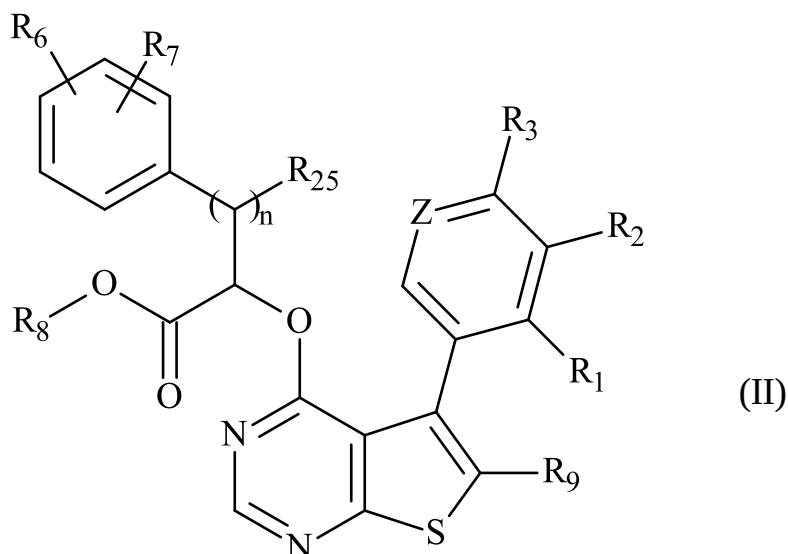
o sus enantiómeros, diastereoisómeros, atropisómeros, o sales de adición de éstos con un ácido o base farmacéuticamente aceptable,

y (b) un compuesto taxano, para uso simultáneo, secuencial o separado.

Dichos compuestos de fórmula (I), su síntesis, su uso en el tratamiento del cáncer y las formulaciones farmacéuticas de éstos, se describen en WO 2015/097123, WO 2016/207216, WO 2016/207217, WO 2016/207225, WO 2016/207226 y WO 2017/125224, cuyos contenidos se incorporan por referencia.

En determinadas realizaciones, el compuesto taxano se selecciona de paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel, tesetaxel, Opaxio® (paclitaxel poliglumex), Abraxane® (nab-paclitaxel) larotaxel, taxoprexina, BMS-184476, hongdoushan A, hongdoushan B, y hongdoushan C, y otros.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una combinación que comprende: (a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II), un caso particular de inhibidor de MCL-1 de fórmula (I):



en la que:

- ♦ Z representa un átomo de nitrógeno o un grupo C-R₄,
- ♦ R₁ representa un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un ciano, -NR₁₁R₁₁', -Cy₈ o un átomo de halógeno,
- ♦ R₂, R₃ y R₄ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁, -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆), o los sustituyentes de una de las parejas (R₂, R₃), (R₃, R₄) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo seleccionado de un grupo

alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ o un oxo,

- ♦ R₆ y R₇ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁, -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆), o los sustituyentes de la pareja (R₆, R₇), cuando se injertan en dos átomos de carbono adyacentes, forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo seleccionado de un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ o un oxo,

- ♦ R₈ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₈) lineal o ramificado, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo arilalquilo(C₁-C₆), o un grupo heteroarilalquilo(C₁-C₆),

- ♦ R₉ representa un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, -Cy₂, -alquilo(C₁-C₆)-Cy₂, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₂, -alquino(C₂-C₆)-Cy₂, -Cy₂-Cy₃, -alquino(C₂-C₆)-O-Cy₂, -Cy₂-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₃, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R₁₄, o -C(O)-NR₁₄R₁₄',

- ♦ R₁₁ y R₁₁' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, o -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁,

o los sustituyentes de la pareja (R₁₁, R₁₁') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el

nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes, pueden estar deuterados,

- 5 ♦ R₁₂ representa -Cy₅, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆,
 -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆,
 -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-Cy₆-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₇,
 -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁R₁₁', -OR₁₁, -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-OR₁₁,
 -SO₂-R₁₁, -C(O)-OR₁₁, o -NH-C(O)-NH-R₁₁,
- 10 ♦ R₁₃, R₁₃', R₁₄ y R₁₄' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente,
- ♦ R₂₅ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆),
- ♦ Cy₁, Cy₂, Cy₃, Cy₅, Cy₆, Cy₇ y Cy₈ independientemente uno de otro, representan un
- 15 grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,
- ♦ n es un número entero igual a 0 ó 1,

entendiéndose que:

- "arilo" significa un grupo fenilo, naftilo, bifenilo, indanilo o indenilo,
- 20 - "heteroarilo" significa cualquier grupo mono o bicíclico compuesto por de 5 a 10 miembros en el anillo, que tiene al menos un resto aromático y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno,
- "cicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo,
- 25 - "heterocicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo, y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, que puede incluir sistemas de anillos fusionados, con puente o espiro,

siendo posible para los grupos arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo así

30 definidos y el alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, estar sustituidos con de 1 a 4 grupos

seleccionados de alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquenilo(C₂-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquinilo(C₂-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, alquilo(C₁-C₆)-S- sustituido opcionalmente, hidroxilo, oxo (o *N*-óxido cuando sea apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR', -O-C(O)-R', -C(O)-NR'R'', -NR'R'', -(C=NR')-OR'', polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, trifluorometoxi, o halógeno, entendiéndose que R' y R'' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes precedentes, pueden estar deuterados,

o sus enantiómeros, diastereoisómeros, atropisómeros, o sales de adición de éstos con un ácido o base farmacéuticamente aceptable,

y (b) un compuesto taxano,
para uso simultáneo, secuencial o separado.

En otra realización, la invención proporciona una combinación que comprende:
(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) como se describe en la presente memoria, y
(b) un compuesto taxano seleccionado de paclitaxel o docetaxel,
o
(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II) como se describe en la presente memoria, y
(b) un compuesto taxano seleccionado de paclitaxel o docetaxel,
para uso simultáneo, secuencial o separado.

En otra realización, la invención proporciona una combinación que comprende:
(a) Compuesto 1: ácido (2*R*)-2-{[(5*S*_a)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y
(b) un compuesto taxano,
para uso simultáneo, secuencial o separado.

Alternativamente, la invención proporciona una combinación que comprende:

(a) Compuesto 2: ácido (2*R*)-2-{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]metoxi}fenil)propanoico, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y

(b) un compuesto taxano,

para uso simultáneo, secuencial o separado.

En otra realización, la invención proporciona una combinación como se describe en la presente memoria, para uso en el tratamiento del cáncer.

En otra realización, la invención proporciona el uso de una combinación como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En otra realización, la invención proporciona un medicamento que contiene, separadamente o conjuntamente,

(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) como se describe en la presente memoria, y

(b) un compuesto taxano,

o

(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II) como se describe en la presente memoria, y

(b) un compuesto taxano,

para administración simultánea, secuencial o separada, y en la que el inhibidor de MCL-1 y el compuesto taxano se proporcionan en cantidades efectivas para el tratamiento del cáncer.

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar una cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva de:

(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) como se describe en la presente memoria, y

(b) un compuesto taxano,

o

(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II) como se describe en la presente memoria, y

(b) un compuesto taxano,
a un sujeto que lo necesita.

En otra realización, el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-{{(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)propanoico (Compuesto 1).

En otra realización, el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-{{(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]metoxi}fenil)propanoico (Compuesto 2).

En otra realización, el compuesto taxano es paclitaxel.

En otra realización, el compuesto taxano es docetaxel.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** ilustra matrices para la inhibición, inhibición en exceso de Loewe e inhibición del crecimiento para combinaciones de paclitaxel con el Compuesto 1 en línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453 representativa.

La **Figura 2** ilustra matrices para la inhibición, inhibición en exceso de Loewe e inhibición del crecimiento para combinaciones de paclitaxel con el Compuesto 1 en línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468 representativa.

La **Figura 3** ilustra matrices para la inhibición, inhibición en exceso de Loewe e inhibición del crecimiento para combinaciones de paclitaxel con el Compuesto 1 en línea celular de cáncer de pulmón H522 representativa.

La **Figura 4** ilustra matrices de combinación ejemplares de efecto de inhibición del crecimiento celular y sinergia para la inhibición del crecimiento celular (izquierda) e inhibición en exceso de Loewe (derecha) proporcionadas por el Compuesto 2 en

combinación con paclitaxel en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-453 en dos experimentos independientes. Los valores en la matriz de efecto varían de 0 (no inhibición) a 100 (inhibición total). Los valores en la matriz de sinergia representan el grado de inhibición del crecimiento en exceso de la aditividad teórica calculada sobre la base de las actividades de los agentes únicos de Compuesto 2 y paclitaxel a las concentraciones ensayadas.

La **Figura 5** ilustra matrices de combinación ejemplares de efecto de inhibición del crecimiento celular y sinergia para la inhibición del crecimiento celular (izquierda) e inhibición en exceso de Loewe (derecha) proporcionadas por el Compuesto 2 en combinación con paclitaxel en la línea celular de cáncer de pulmón H522 en dos experimentos independientes. Los valores en la matriz de efecto varían de 0 (no inhibición) a 100 (inhibición total). Los valores en la matriz de sinergia representan el grado de inhibición del crecimiento en exceso de la aditividad teórica calculada sobre la base de las actividades de los agentes únicos de Compuesto 2 y paclitaxel a las concentraciones ensayadas.

La **Figura 6** ilustra el efecto sinérgico del Compuesto 2 con docetaxel. Las células SK-BR-3 se trataron con docetaxel (2 nM), o se dejaron sin tratar en presencia del Compuesto 2 (30 nM), con o sin QVD (10 μ M) durante 72 horas antes del análisis de viabilidad con tinción con yoduro de propidio (PI). Los resultados se presentan como un porcentaje de células no tratadas y representan 3-5 experimentos independientes.

La **Figura 7** ilustra el efecto sinérgico del Compuesto 2 con docetaxel. Las células SK-BR-3 se trataron con concentraciones crecientes de Compuesto 2 y docetaxel durante 72 horas, después se sometieron a ensayos de viabilidad usando Cell Titer Glo seguido de análisis de puntuación BLISS. Los valores de sinergia BLISS son $> 0,0$ en el eje vertical.

La **Figura 8** ilustra la eficacia del Compuesto 2 con docetaxel en la mejora de la supervivencia animal en modelos TNBC PDX. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones que portan 110T (n = 10-12 ratones por brazo), 838T (n = 12 ratones por brazo), o PDX OD-BRE-0589 (8 ratones por brazo) tratados con vehículo solo (línea negra),

docetaxel (10 mg/kg i.p. en el día 0 y 21) más vehículo para el Compuesto 2 (línea gris oscura), Compuesto 2 (25 mg/kg i.v. una vez a la semana durante 6 semanas) más vehículo para docetaxel (línea gris clara), o docetaxel y Compuesto 2 combinados (línea discontinua). Paneles derechos: curvas de volumen tumoral individual. El modelo PDX 838T se terminó a los 120 días debido a enfermedad relacionada con la edad, independiente de terapia. Se muestra el valor p de rango logarítmico (Mantel-Cox) para la terapia de combinación frente a docetaxel solo.

La **Figura 9** ilustra el mantenimiento del peso corporal normal durante la terapia. Los ratones NOD SCID con receptor gamma de IL2 inactivado se trataron con docetaxel (15 mg/kg, una vez i.p.) y Compuesto 2 a 25 ó 50 mg/kg (3 ratones por grupo, inyecciones i.v., una vez a la semana durante 3 semanas). Su peso corporal se monitorizó tres veces a la semana durante 3 semanas. La terapia con el Compuesto 2 como agente único o combinado con docetaxel se toleró bien.

La **Figura 10** ilustra la eficacia de paclitaxel y Compuesto 1 (denominado Compuesto A en la Figura) solos y en combinación en ratas hembras desnudas que portan xenoinjertos MDA-MB-231, un modelo de TNBC. Los tumores se establecieron en ratas hembras desnudas por inoculación subcutánea de células TNBC MDA-MB-231 humanas (1×10^7 células/200 μ L de HBSS/Matrigel 1:1 v/v). Los animales con tumores de tamaño apropiado se aleatorizaron en grupos ($n = 7-8$) con un volumen tumoral medio de aproximadamente 400 mm³. Los volúmenes tumorales se estimaron usando los dos diámetros mayores según $(L \times W^2 \times \pi/6)$ y los pesos corporales se midieron 2-3 veces a la semana. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM o como volúmenes tumorales individuales. * $p < 0,05$, comparado con el grupo de vehículo (ANOVA de una vía con ensayo post hoc de Dunnett).

La **Figura 11** ilustra la tolerabilidad de paclitaxel y Compuesto 1 (denominado Compuesto A en la Figura) solos y en combinación en ratas hembras desnudas que portan xenoinjertos MDA-MB-231, un modelo de TNBC. Los tumores se establecieron en ratas hembras desnudas por inoculación subcutánea de células TNBC MDA-MB-231 humanas (1×10^7 células/200 μ L de HBSS/Matrigel 1:1 v/v). Los animales con tumores de tamaño

apropiado se aleatorizaron en grupos ($n = 7-8$) con un volumen tumoral medio de aproximadamente 400 mm^3 . Los volúmenes tumorales se estimaron usando los dos diámetros mayores según $(L \times W^2 \times \pi/6)$ y los pesos corporales se midieron 2-3 veces a la semana.

5 La **Figura 12** ilustra la eficacia de paclitaxel y Compuesto 1 (denominado Compuesto A en la Figura) solos y en combinación a diferentes esquemas de dosis en ratas hembras desnudas que portan xenoinjertos MDA-MB-231, un modelo de TNBC. Los tumores se establecieron en ratas hembras desnudas por inoculación subcutánea de células TNBC MDA-MB-231 humanas (1×10^7 células/200 μL de HBSS/Matrigel 1:1 v/v). Los animales
10 con tumores de tamaño apropiado se aleatorizaron en grupos ($n = 7-8$) con un volumen tumoral medio de aproximadamente 400 mm^3 . Los volúmenes tumorales se estimaron usando los dos diámetros mayores según $(L \times W^2 \times \pi/6)$ y los pesos corporales se midieron 2-3 veces a la semana. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM o como volúmenes tumorales individuales. * $p < 0,05$, comparado con el grupo de vehículo (ANOVA de una
15 vía con ensayo post hoc de Dunnett).

La **Figura 13** ilustra la tolerabilidad de paclitaxel y Compuesto 1 (denominado Compuesto A en la Figura) solos y en combinación a diferentes esquemas de dosis en ratas hembras desnudas que portan xenoinjertos MDA-MB-231, un modelo de TNBC. Los tumores se establecieron en ratas hembras desnudas por inoculación subcutánea de células TNBC
20 MDA-MB-231 humanas (1×10^7 células/200 μL de HBSS/Matrigel 1:1 v/v). Los animales con tumores de tamaño apropiado se aleatorizaron en grupos ($n = 7-8$) con un volumen tumoral medio de aproximadamente 400 mm^3 . Los volúmenes tumorales se estimaron usando los dos diámetros mayores según $(L \times W^2 \times \pi/6)$ y los pesos corporales se midieron 2-3 veces a la semana.

25 La **Figura 14** ilustra el efecto sinérgico del Compuesto 1 con docetaxel.

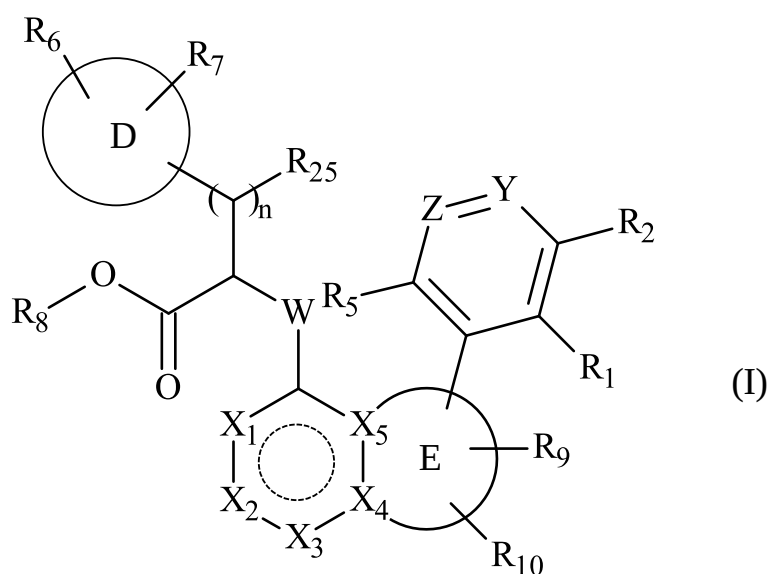
La **Figura 15** ilustra la actividad antitumoral de docetaxel y Compuesto 1 administrados IV solos y en combinación en ratones hembras SCID que portan modelo de TNBC derivado de paciente. El docetaxel se administró en primer lugar seguido bien 30 minutos ó

72 horas después del Compuesto 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona, por lo tanto, en la Realización E1, una combinación que comprende:

5 (a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I):



en la que:

- ◆ D representa un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,
- 10 ◆ E representa un anillo furilo, tienilo o pirrolilo,
- ◆ X₁, X₃, X₄ y X₅ independientemente uno de otro representan un átomo de carbono o un átomo de nitrógeno,
- ◆ X₂ representa un grupo C-R₂₆ o un átomo de nitrógeno,
- ◆  significa que el anillo es aromático,
- 15 ◆ Y representa un átomo de nitrógeno o un grupo C-R₃,
- ◆ Z representa un átomo de nitrógeno o un grupo C-R₄,
- ◆ R₁ representa un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquenilo(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquinilo(C₂-C₆) lineal o

ramificado, un grupo polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆), un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -Cy₈, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o-SO₂-alquilo(C₁-C₆),

- ♦ R₂, R₃, R₄ y R₅ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆), un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁, -O-alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆), o los sustituyentes de la pareja (R₁, R₂), (R₂, R₃), (R₃, R₄), (R₄, R₅) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con de 1 a 2 grupos seleccionados de halógeno, alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ u oxo,

- ♦ R₆ y R₇ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁, -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁',

-SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆),

o los sustituyentes de la pareja (R₆, R₇), cuando se injertan en dos átomos de carbono adyacentes, forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo seleccionado de un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ o un oxo,

♦ W representa un grupo -CH₂-, un grupo -NH- o un átomo de oxígeno,

♦ R₈ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₈) lineal o ramificado, un grupo -CHR_aR_b, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo arilalquilo(C₁-C₆), o un grupo heteroarilalquilo(C₁-C₆),

♦ R₉ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, -Cy₂, -alquilo(C₁-C₆)-Cy₂, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₂, -alquino(C₂-C₆)-Cy₂, -Cy₂-Cy₃, -alquino(C₂-C₆)-O-Cy₂, -Cy₂-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₃, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R₁₄, o -C(O)-NR₁₄R₁₄',

♦ R₁₀ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo arilalquilo(C₁-C₆), un grupo cicloalquilalquilo(C₁-C₆), un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, o -alquilo(C₁-C₆)-O-Cy₄,

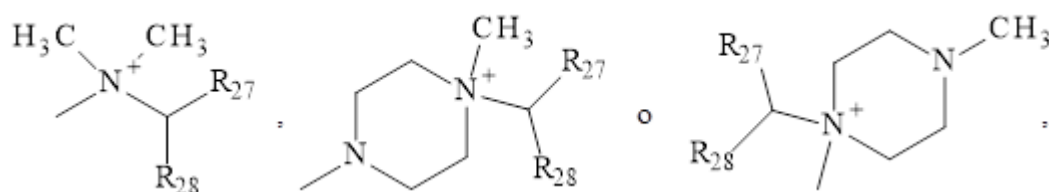
o los sustituyentes de la pareja (R₉, R₁₀), cuando se injertan en dos átomos de carbono adyacentes, forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno,

♦ R₁₁ y R₁₁' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, o -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁,

o los sustituyentes de la pareja (R₁₁, R₁₁') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7

miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con de 1 a 2 grupos que representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes, pueden estar deuterados,

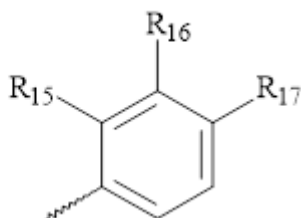
- ♦ R₁₂ representa -Cy₅, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-Cy₆-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₇, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₉, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-Cy₉, -NH-C(O)-NH-R₁₁, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁-alquilo(C₀-C₆)-Cy₉, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁R₁₁', -OR₁₁, -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-OR₁₁, -SO₂-R₁₁, -C(O)-OR₁₁,



siendo posible para el amonio así definido existir como una forma zwitteriónica o tener un contraión aniónico monovalente,

- ♦ R₁₃, R₁₃', R₁₄ y R₁₄' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente,
- ♦ R_a representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado,
- ♦ R_b representa un grupo -O-C(O)-O-R_c, un grupo -O-C(O)-NR_cR_c', o un grupo -O-P(O)(OR_c)₂,
- ♦ R_c y R_c' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₈) lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆), o un grupo alcóxicarbonilo(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆), o los sustituyentes de la pareja (R_c, R_c') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado,

- ♦ Cy₁, Cy₂, Cy₃, Cy₄, Cy₅, Cy₆, Cy₇, Cy₈ y Cy₁₀ independientemente uno de otro, representan un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,



- ♦ Cy₉ representa

5 o Cy₉ representa un grupo heteroarilo que está sustituido con un grupo seleccionado de -O-P(O)(OR₂₀)₂; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; hidroxi; hidroxialquilo(C₁-C₆); -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo; o -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ,

- ♦ R₁₅ representa un átomo de hidrógeno; un grupo -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; un grupo alcoxi(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado; un grupo -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ; o un grupo -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo,

- ♦ R₁₆ representa un átomo de hidrógeno; un grupo hidroxi; un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆); un grupo -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo; un grupo (CH₂)_r-U-V-O-P(O)(OR₂₀)₂; un grupo -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; un grupo -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; un grupo -(CH₂)_p-O-C(O)-NR₂₂R₂₃; o un grupo -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ,

- ♦ R₁₇ representa un átomo de hidrógeno; un grupo -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; un grupo -O-P(O)(OR₂₀)₂; un grupo -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; un grupo hidroxi; un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆); un grupo -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-heterocicloalquilo; un grupo -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' ; o un ácido aldónico,

- ♦ M⁺ representa un catión monovalente farmacéuticamente aceptable,
- ♦ U representa un enlace o un átomo de oxígeno,
- ♦ V representa un grupo -(CH₂)_s- o un grupo -C(O)-,
- ♦ R₁₈ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alcoxi(C₁-C₆)alquilo(C₁-C₆),
- ♦ R₁₉ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆),
- ♦ R₂₀ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado,

- ◆ R_{21} y R_{21}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado, o un grupo hidroxialquilo(C_1-C_6), o los sustituyentes de la pareja (R_{21} , R_{21}') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,
- ◆ R_{22} representa un grupo alcoxi(C_1-C_6)alquilo(C_1-C_6), un grupo $-(CH_2)_p-NR_{24}R_{24}'$, o un grupo $-(CH_2)_p-O-(CHR_{18}-CHR_{19}-O)_q-R_{20}$,
- ◆ R_{23} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alcoxi(C_1-C_6)alquilo(C_1-C_6), o los sustituyentes de la pareja (R_{22} , R_{23}) forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 18 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 5 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo heterocicloalquilo,
- ◆ R_{24} y R_{24}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado, o los sustituyentes de la pareja (R_{24} , R_{24}') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,
- ◆ R_{25} representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo hidroxialquilo(C_1-C_6),
- ◆ R_{26} representa un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado, o un grupo ciano,
- ◆ R_{27} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,

- ♦ R_{28} representa un grupo $-O-P(O)(O^-)(O^-)$, un grupo $-O-P(O)(O^-)(OR_{30})$, un grupo $-O-P(O)(OR_{30})(OR_{30}')$, un grupo $-O-SO_2-O^-$, un grupo $-O-SO_2-OR_{30}$, $-Cy_{10}$, un grupo $-O-C(O)-R_{29}$, un grupo $-O-C(O)-OR_{29}$ o un grupo $-O-C(O)-NR_{29}R_{29}'$;
- 5 ♦ R_{29} y R_{29}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo aminoalquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado,
- ♦ R_{30} y R_{30}' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado o un grupo arilalquilo(C_1-C_6),
- 10 ♦ n es un número entero igual a 0 ó 1,
- ♦ p es un número entero igual a 0, 1 ó 2,
- ♦ q es un número entero igual a 1, 2, 3 ó 4,
- ♦ r y s son independientemente un número entero igual a 0 ó 1,

entendiéndose que:

- 15 - "arilo" significa un grupo fenilo, naftilo, bifenilo, indanilo o indenilo,
- "heteroarilo" significa cualquier grupo mono o bicíclico compuesto por de 5 a 10 miembros en el anillo, que tiene al menos un resto aromático y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno,
- "cicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico
- 20 que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo,
- "heterocicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo, y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, que puede incluir sistemas de anillos fusionados, con puente o espiro,
- 25 siendo posible para los grupos arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo así definidos y el alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, estar sustituidos con de 1 a 4 grupos seleccionados de alquilo(C_1-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquenilo(C_2-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquinilo(C_2-C_6) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, alcoxi(C_1-C_6) lineal o ramificado sustituido
- 30 opcionalmente, alquilo(C_1-C_6)-S- sustituido opcionalmente, hidroxilo, oxo (o *N*-óxido

cuando sea apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR', -O-C(O)-R', -C(O)-NR'R'', -NR'R'',
-(C=NR')-OR'', polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, trifluorometoxi, o halógeno,
entendiéndose que R' y R'' independientemente uno de otro representan un átomo de
hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, y
5 entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes
precedentes, pueden estar deuterados,

o sus enantiómeros, diastereoisómeros, atropisómeros, o sales de adición de éstos con un
ácido o base farmacéuticamente aceptable,

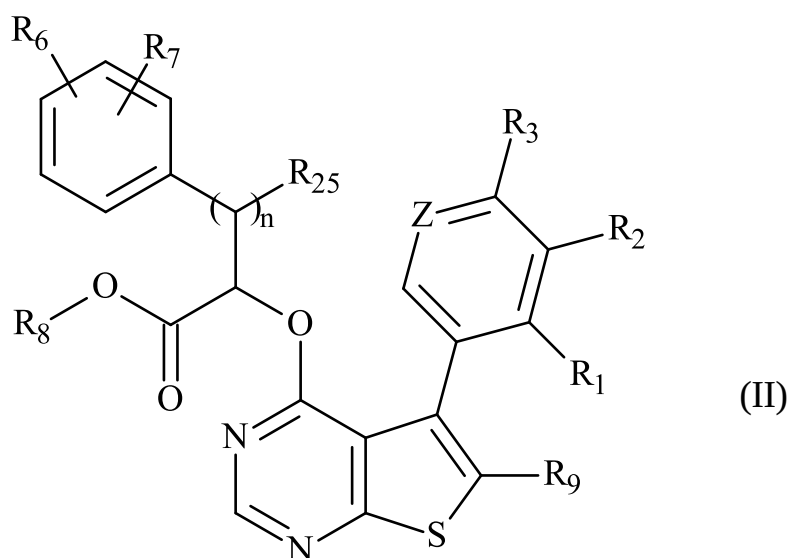
y (b) un compuesto taxano,

10 para uso simultáneo, secuencial o separado.

En la presente memoria se describen realizaciones (E) enumeradas adicionales de la
invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización pueden
combinarse con otras características especificadas para proporcionar realizaciones
adicionales de la presente invención.

15 E2. Una combinación según E1, que comprende:

(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II), un caso particular de inhibidor de MCL-1 de
fórmula (I):



en la que:

- ♦ Z representa un átomo de nitrógeno o un grupo C-R₄,
- ♦ R₁ representa un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado,
5 un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un ciano, -NR₁₁R₁₁', -Cy₈ o un átomo de halógeno,
- ♦ R₂, R₃ y R₄ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado,
10 un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁, -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁,
15 -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆),
o los sustituyentes de una de las parejas (R₂, R₃), (R₃, R₄) forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3
20 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo seleccionado de un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ o un oxo,
- ♦ R₆ y R₇ independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado,
25 un polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado, grupo -S-alquilo(C₁-C₆), un grupo ciano, un grupo nitro, -alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁, -alqueno(C₂-C₆)-Cy₁, -alquino(C₂-C₆)-Cy₁, -O-alquilo(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁,
30 -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -alquilo(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', o -SO₂-alquilo(C₁-C₆),
o los sustituyentes de la pareja (R₆, R₇), cuando se injertan en dos átomos de

- carbono adyacentes, forman junto con los átomos de carbono a los que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7 miembros en el anillo, que puede contener de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el anillo resultante puede estar sustituido con un grupo seleccionado de un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, -NR₁₃R₁₃', -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁ o un oxo,
- 5
- ♦ R₈ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₈) lineal o ramificado, un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo arilalquilo(C₁-C₆), o un grupo heteroarilalquilo(C₁-C₆),
- 10
- ♦ R₉ representa un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquenilo(C₂-C₆) lineal o ramificado, un grupo alquinilo(C₂-C₆) lineal o ramificado, -Cy₂, -alquilo(C₁-C₆)-Cy₂, -alquenilo(C₂-C₆)-Cy₂, -alquinilo(C₂-C₆)-Cy₂, -Cy₂-Cy₃, -alquinilo(C₂-C₆)-O-Cy₂, -Cy₂-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₃, un átomo de halógeno, un grupo ciano, -C(O)-R₁₄, o -C(O)-NR₁₄R₁₄',
- 15
- ♦ R₁₁ y R₁₁' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, o -alquilo(C₀-C₆)-Cy₁,
o los sustituyentes de la pareja (R₁₁, R₁₁') forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo aromático o no aromático compuesto por de 5 a 7
- 20
- miembros en el anillo, que puede contener además del átomo de nitrógeno de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, entendiéndose que el nitrógeno en cuestión puede estar sustituido con un grupo que representa un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes, pueden estar
- 25
- deuterados,
- ♦ R₁₂ representa -Cy₅, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-alquilo(C₀-C₆)-NR₁₁-alquilo(C₀-C₆)-Cy₆, -Cy₅-Cy₆-O-alquilo(C₀-C₆)-Cy₇, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁R₁₁', -OR₁₁, -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -O-alquilo(C₁-C₆)-OR₁₁, -SO₂-R₁₁, -C(O)-OR₁₁, o -NH-C(O)-NH-R₁₁,
- 30
- ♦ R₁₃, R₁₃', R₁₄ y R₁₄' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno, o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente,

- ◆ R₂₅ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, o un grupo hidroxialquilo(C₁-C₆),
- ◆ Cy₁, Cy₂, Cy₃, Cy₅, Cy₆, Cy₇ y Cy₈ independientemente uno de otro, representan un grupo cicloalquilo, un grupo heterocicloalquilo, un grupo arilo o un grupo heteroarilo,
- ◆ n es un número entero igual a 0 ó 1,

entendiéndose que:

- "arilo" significa un grupo fenilo, naftilo, bifenilo, indanilo o indenilo,
- "heteroarilo" significa cualquier grupo mono o bicíclico compuesto por de 5 a 10 miembros en el anillo, que tiene al menos un resto aromático y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno,
- "cicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo,
- "heterocicloalquilo" significa cualquier grupo carbocíclico no aromático mono o bicíclico que contiene de 3 a 10 miembros en el anillo, y que contiene de 1 a 3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre y nitrógeno, que puede incluir sistemas de anillos fusionados, con puente o espiro,

siendo posible para los grupos arilo, heteroarilo, cicloalquilo y heterocicloalquilo así definidos y el alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, estar sustituidos con de 1 a 4 grupos seleccionados de alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alqueno(C₂-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, grupo alquino(C₂-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, alcoxi(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, alquilo(C₁-C₆)-S- sustituido opcionalmente, hidroxilo, oxo (o *N*-óxido cuando sea apropiado), nitro, ciano, -C(O)-OR', -O-C(O)-R', -C(O)-NR'R'', -NR'R'', -(C=NR')-OR'', polihaloalquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado, trifluorometoxi, o halógeno, entendiéndose que R' y R'' independientemente uno de otro representan un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo(C₁-C₆) lineal o ramificado sustituido opcionalmente, y entendiéndose que uno o más de los átomos de carbono de los posibles sustituyentes precedentes, pueden estar deuterados,

o sus enantiómeros, diastereoisómeros, atropisómeros, o sales de adición de éstos con un ácido o base farmacéuticamente aceptable,

y (b) un compuesto taxano,

para uso simultáneo, secuencial o separado.

5 E3. Una combinación según E1 o E2, en la que el compuesto taxano es paclitaxel o docetaxel.

E4. Una combinación según E1 o E2, en la que el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-
{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)
tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]
10 metoxi}fenil)propanoico.

E5. Una combinación según E1 o E2, en la que el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-
{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)
tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}
fenil)propanoico.

15 E6. Una combinación según E1 o E2, en la que el compuesto taxano es paclitaxel.

E7. Una combinación según E1 o E2, en la que el compuesto taxano es docetaxel.

E8. Una combinación según E1 o E2, en la que el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-
{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)
tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}
20 fenil)propanoico y el compuesto taxano es paclitaxel.

E9. Una combinación según E1 o E2, en la que el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-
{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)
tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]
metoxi}fenil)propanoico y el compuesto taxano es paclitaxel.

E10. Una combinación según E1 o E2, en la que el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-
{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)
tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}
fenil)propanoico y el compuesto taxano es docetaxel.

5 E11. Una combinación según E1 o E2, en la que el inhibidor de MCL-1 es ácido (2*R*)-2-
{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(5-fluorofuran-2-il)
tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[1-(2,2,2-trifluoroetil)-1*H*-pirazol-5-il]
metoxi}fenil)propanoico y el compuesto taxano es docetaxel.

10 E12. Una combinación según E5, en la que la dosis de ácido (2*R*)-2-{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-
metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]
pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)
propanoico durante el tratamiento de combinación es de 25 mg a 1.500 mg.

15 E13. Una combinación según E5 o E12, en la que el ácido (2*R*)-2-{[(5*S_a*)-5-{3-cloro-2-
metil-4-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]fenil}-6-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]
pirimidin-4-il]oxi}-3-(2-{[2-(2-metoxifenil)pirimidin-4-il]metoxi}fenil)
propanoico se administra durante el tratamiento de combinación una vez a la semana.

E14. Una combinación según cualquiera de E1 a E13, en la que el inhibidor de MCL-1 se
administra oralmente y el compuesto taxano se administra intravenosamente.

20 E15. Una combinación según cualquiera de E1 a E13, en la que el inhibidor de MCL-1 y el
compuesto taxano se administran intravenosamente.

E16. Una combinación según cualquiera de E1 a E15, para uso en el tratamiento del
cáncer.

25 E17. La combinación para uso según E16, en la que el inhibidor de MCL-1 y el compuesto
taxano se proporcionan en cantidades que son conjuntamente terapéuticamente efectivas
para el tratamiento del cáncer.

E18. La combinación para uso según E16, en la que el inhibidor de MCL-1 y el compuesto taxano se proporcionan en cantidades que son sinérgicamente efectivas para el tratamiento del cáncer.

5 E19. La combinación para uso según E16, en la que el inhibidor de MCL-1 y el compuesto taxano se proporcionan en cantidades sinérgicamente efectivas lo que permite una reducción de la dosis requerida para cada compuesto en el tratamiento del cáncer, mientras se proporciona un tratamiento eficaz del cáncer, con eventualmente una reducción en los efectos secundarios.

10 E20. La combinación para uso según cualquiera de E16 a E19, en la que el cáncer es cáncer de mama.

E21. La combinación para uso según E20, en la que el cáncer es cáncer de mama triple negativo, particularmente cáncer de mama triple negativo quimiorresistente, más particularmente, cáncer de mama triple negativo resistente a terapia con taxano.

15 E22. La combinación para uso según cualquiera de E16 a E19, en la que el cáncer es cáncer de pulmón, particularmente cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.

E23. Una combinación según cualquiera de E1 a E15, que comprende además uno o más excipientes.

20 E24. Composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación según cualquiera de E1 a E15, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

E25. Composiciones farmacéuticas según E24, para uso en el tratamiento del cáncer.

E26. Composiciones farmacéuticas para uso según E25, en la que el cáncer es cáncer de mama.

E27. Composiciones farmacéuticas para uso según E26, en la que el cáncer es cáncer de mama triple negativo, particularmente cáncer de mama triple negativo quimiorresistente, más particularmente, cáncer de mama triple negativo resistente a terapia con taxano.

5 E28. Composiciones farmacéuticas para uso según E25, en la que el cáncer es cáncer de pulmón, particularmente cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.

E29. El uso de una combinación según cualquiera de E1 a E15, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

E30. El uso según E29, en el que el cáncer es cáncer de mama.

10 E31. El uso según E30, en el que el cáncer es cáncer de mama triple negativo, particularmente cáncer de mama triple negativo quimiorresistente, más particularmente, cáncer de mama triple negativo resistente a terapia con taxano.

E32. El uso según E29, en el que el cáncer es cáncer de pulmón, particularmente cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas.

15 E33. Un medicamento que contiene, separadamente o conjuntamente,
(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) como se define en E1, y
(b) un compuesto taxano,
para administración simultánea, secuencial o separada, y en la que el inhibidor de MCL-1 y el compuesto taxano se proporcionan en cantidades efectivas para el tratamiento del
20 cáncer.

E34. Un medicamento que contiene, separadamente o conjuntamente,
(a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II) como se define en E2, y
(b) un compuesto taxano,

para administración simultánea, secuencial o separada, y en la que el inhibidor de MCL-1 y el compuesto taxano se proporcionan en cantidades efectivas para el tratamiento del cáncer.

E35. Un método para tratar cáncer, que comprende administrar una cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva de:

- (a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) como se define en E1, y
 - (b) un compuesto taxano,
- a un sujeto que lo necesita.

E36. Un método para tratar cáncer, que comprende administrar una cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva de:

- (a) un inhibidor de MCL-1 de fórmula (II) como se define en E2, y
 - (b) un compuesto taxano,
- a un sujeto que lo necesita.

E37. Un método para sensibilizar a un paciente que es (i) refractario al menos a un tratamiento de quimioterapia, o (ii) en recidiva después de tratamiento con quimioterapia, o ambos (i) y (ii), en el que el método comprende administrar una cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva de inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) como se define en E1 en combinación con un compuesto taxano como se describe en la presente memoria, a dicho paciente.

E38. Un método para sensibilizar a un paciente que es (i) refractario al menos a un tratamiento de quimioterapia, o (ii) en recidiva después de tratamiento con quimioterapia, o ambos (i) y (ii), en el que el método comprende administrar una cantidad conjuntamente terapéuticamente efectiva de inhibidor de MCL-1 de fórmula (II) como se define en E2 en combinación con un compuesto taxano como se describe en la presente memoria, a dicho paciente.

‘Combinación’ se refiere bien a una combinación de dosis fija en una forma de dosificación unitaria (por ejemplo, cápsula, comprimido, o sobre), combinación de dosis no fija, o un kit de partes para la administración combinada donde un compuesto de la presente invención y uno o más compañeros de combinación (por ejemplo, otro fármaco como se explica más adelante, también referido como ‘agente terapéutico’ o ‘co-agente’) pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o separadamente en intervalos de tiempo, especialmente donde estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de la combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

Los términos ‘co-administración’ o ‘administración combinada’ o semejantes tal y como se utilizan en la presente memoria se pretende que engloben la administración del compañero de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesita (por ejemplo, un paciente) y se pretende que incluyan regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma ruta de administración o al mismo tiempo.

El término ‘combinación de dosis fija’ significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) y uno o más compañeros de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en la forma de una única entidad o dosificación.

El término ‘combinación de dosis no fija’ significa que los ingredientes activos, por ejemplo, un compuesto de la presente invención y uno o más compañeros de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas bien simultáneamente o secuencialmente, sin límites de tiempo específicos, en el que dicha administración proporciona niveles terapéuticamente efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Lo último también es aplicable a terapia de mezcla, por ejemplo, la administración de tres o más ingredientes activos.

‘Cáncer’ significa una clase de enfermedad en la que un grupo de células presenta crecimiento incontrolado. Los tipos de cáncer incluyen tumores sólidos incluyendo carcinoma, sarcoma, o blastoma. En particular, ‘cáncer’ se refiere a cáncer de mama y de pulmón.

El término ‘conjuntamente terapéuticamente efectivo’ significa que los agentes terapéuticos pueden proporcionarse separadamente (de una manera cronológicamente escalonada, especialmente una manera específica de secuencia) en intervalos de tiempo tales que prefieren, en el animal de sangre caliente, especialmente ser humano, que se va a tratar, todavía muestran una interacción (preferiblemente sinérgica) (efecto terapéutico conjunto). Si éste es o no el caso puede determinarse, *inter alia*, por el seguimiento de los niveles sanguíneos, mostrando que ambos compuestos están presentes en la sangre del ser humano que se va a tratar al menos durante determinados intervalos de tiempo.

‘Sinérgicamente efectivo’ o ‘sinergia’ significa que el efecto terapéutico observado después de la administración de dos o más agentes es mayor que la suma de los efectos terapéuticos observados después de la administración de cada agente único.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término ‘tratar’, ‘tratando’ o ‘tratamiento’ de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o parar o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de ésta). En otra realización, ‘tratar’, ‘tratando’ o ‘tratamiento’ se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización más, ‘tratar’, ‘tratando’ o ‘tratamiento’ se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien físicamente, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos.

Tal y como se usa en la presente memoria, un sujeto ‘necesita’ un tratamiento si dicho sujeto se beneficiaría biológicamente, médicamente o en calidad de vida de dicho tratamiento.

En otro aspecto, se proporciona un método para sensibilizar a un ser humano que es (i) refractario al menos a un tratamiento de quimioterapia, o (ii) en recidiva después de tratamiento con quimioterapia, o ambos (i) y (ii), en el que el método comprende administrar un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) o fórmula (II) en combinación con un compuesto taxano, como se describe en la presente memoria, al paciente. Un paciente que

se sensibiliza es un paciente que responde al tratamiento que implica la administración de un inhibidor de MCL-1 de fórmula (I) o fórmula (II) en combinación con un compuesto taxano, como se describe en la presente memoria, o que no ha desarrollado resistencia a dicho tratamiento.

- 5 'Medicamento' significa una composición farmacéutica, o una combinación de varias composiciones farmacéuticas, que contiene uno o más ingredientes activos en presencia de uno o más excipientes.

En las composiciones farmacéuticas según la invención, la proporción de ingredientes activos en peso (peso de los ingredientes activos sobre el peso total de la composición) es
10 de 5 a 50%.

Entre las composiciones farmacéuticas según la invención se usarán más especialmente aquellas que son adecuadas para administración por la ruta oral, parenteral y especialmente intravenosa, per- o trans-cutánea, nasal, rectal, perlingual, ocular o respiratoria, más específicamente comprimidos, grageas, comprimidos sublinguales, cápsulas de gelatina
15 dura, pastillas sublinguales, cápsulas, comprimidos para chupar, preparaciones inyectables, aerosoles, gotas oculares o nasales, supositorios, cremas, pomadas, geles dérmicos etc.

Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables seleccionados de diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes de disgregación, estabilizantes, conservantes, absorbentes, colorantes,
20 edulcorantes, saporíferos etc.

Como ejemplo no limitativo pueden mencionarse:

- ♦ *como diluyentes*: lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, glicerol,
- ♦ *como lubricantes*: sílice, talco, ácido esteárico y sus sales de magnesio y calcio, polietilen glicol,
- 25 ♦ *como aglutinantes*: silicato de magnesio y aluminio, almidón, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona,
- ♦ *como disgregantes*: agar, ácido algínico y su sal de sodio, mezclas efervescentes.

Los compuestos de la combinación pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. La ruta de administración es preferiblemente la infusión o inyección intravenosa, y las composiciones farmacéuticas correspondientes pueden permitir la liberación instantánea o retardada de los ingredientes activos. Los compuestos de la combinación pueden administrarse además en la forma de dos composiciones farmacéuticas separadas, conteniendo cada una uno de los ingredientes activos, o en la forma de una única composición farmacéutica, en la que los ingredientes activos están mezclados.

El régimen de dosificación útil varía según el sexo, edad y peso del paciente, la ruta de administración, la naturaleza del cáncer y de cualesquiera tratamientos asociados y varía de 25 mg a 1.500 mg de inhibidor de MCL-1 a la semana, más preferiblemente de 50 mg a 1.400 mg a la semana. La dosis del compuesto taxano será la misma que la usada cuando se administra solo.

DATOS FARMACOLÓGICOS

EJEMPLO 1: Efecto *in vitro* en la proliferación de la combinación de inhibidor de MCL-1 (Compuesto 1) con paclitaxel en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón

5 El efecto en la proliferación de la combinación de inhibidor de MCL-1 (Compuesto 1) con paclitaxel se evaluó en un panel de 19 líneas celulares de cáncer de mama (BT-20, BT-474, BT-549, Cal-148, HCC1143, HCC1395, HCC1500, HCC1937, HCC1954, HCC38, HCC70, Hs 578T, MCF7, MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-453, MDA-MB-468 y SK-BR-3) y 3 líneas celulares de cáncer de pulmón
10 (H522, H23 y A549).

Material y método

Los compuestos se disolvieron en 100% DMSO (Sigma, Catálogo #D2438-50ML) a una concentración madre de 10 mM y se almacenaron a -20°C hasta el uso. Los compuestos se dispusieron en placas de 96 pocillos profundos de 2 ml (Greiner bio-one, número de
15 catálogo 780271) diluidos de forma seriada 3 veces. El Compuesto 1 se usó sobre un intervalo de concentración de 0,0 – 10,0 μ M. El paclitaxel se usó sobre un intervalo de concentración de 0,0 – 1,0 μ M en células de cáncer de mama y un intervalo de 0,0 – 2,0 μ M en células de cáncer de pulmón.

Todas las líneas celulares se adquirieron en la American Type Culture Collection y se
20 cultivaron según las recomendaciones del proveedor. Todas las líneas se suplementaron con 10% FBS (GIBCO, Número de catálogo 10099-141). Se determinó que todas las líneas celulares carecían de contaminación por micoplasma por un ensayo de detección por PCR realizado en Idexx Radil (Columbia, MO, EEUU) y se autentificaron por análisis por SNP. Las células se descongelaron de preparaciones madre congeladas, se expandieron a través
25 de ≥ 1 subcultivo y se crecieron a 37°C en 5% CO₂. Las células se expandieron a matraces T-75 y se evaluaron para viabilidad usando un contador Beckman-Coulter ViCell

antes de plaquearlas. Para dividir y expandir las líneas celulares, las células se despegaron de los matraces usando 0,25% Tripsina-EDTA (Corning Costar, Catálogo #25-053-CL).

La proliferación celular se midió en ensayos de 72 horas con CellTiter-Glo™ (CTG) y todos los resultados se muestran como el resultado de al menos medidas en triplicado. Las células se dispensaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos tratadas (Costar, número de catálogo 3904) con un volumen final de 80 µL de medio y a una densidad de 3.000 células por pocillo. 16 a 24 horas después de plaquear, 20 µL de cada serie de dilución de los compuestos se transfirieron a placas que contenían las células, resultando en intervalos de concentración del compuesto indicados anteriormente y una concentración final de DMSO de 0,16%. Adicionalmente, se ensayó una placa en el día cero en este tiempo usando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo®, como se describe más adelante. Después de 72 horas de tratamiento con los compuestos, los efectos de los compuestos en la proliferación celular se determinaron usando el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo™ (Promega, Catálogo #G7573). Éste es un método homogéneo para determinar el número de células viables en cultivo sobre la base de la cuantificación del ATP presente, que apunta la presencia de células metabólicamente activas. El método se describe con detalle en el Boletín Técnico, TB288 Promega. Brevemente, se añadieron 100 µl de Reactivo CTG a placas y las placas se incubaron durante 20-30 minutos en un agitador orbital. Las placas se leyeron entonces en el lector de placas Perkin Elmer Victor™ X4.

El porcentaje de inhibición del crecimiento, inhibición en exceso e inhibición del crecimiento se calcularon usando software Combo Module usando el modelo de sinergia de Loewe (como se describe en Lehar et al., *Nature Biotechnology* 2009, 27(7), 659-66), que mide el efecto en el crecimiento por encima de lo que se esperaría si los dos fármacos se comportaran de una manera aditiva de la dosis. Los números positivos representan áreas de sinergia creciente. El porcentaje de la inhibición del crecimiento respecto a DMSO se presenta en el panel marcado “*Inhibición*”. La cantidad de inhibición en exceso de la cantidad esperada está en el panel marcado “*Inhibición en Exceso de Loewe*”. La cantidad de inhibición normalizada respecto al día cero se presenta en el panel marcado “*Inhibición del Crecimiento*”. Las concentraciones de Compuesto 1 se muestran a lo largo de la fila

inferior desde la izquierda a la derecha y las concentraciones crecientes de paclitaxel a lo largo de la columna más a la izquierda desde la parte inferior a la superior. Todos los puntos remanentes en las rejillas presentan resultados de una combinación de los dos inhibidores que corresponde a las concentraciones de agente único indicadas en los dos ejes. La CI_{50} absoluta se determinó encontrando la concentración de compuesto en la que la curva calculada se cruza con la marca de 50% de actividad. La CI_{50} absoluta y la puntuación de sinergia se calcularon en software Combo module como se describe en Lehar et al. 2009.

Puntuación de Sinergia

$SS \sim 0 \rightarrow$ Aditivo de la Dosis

$SS > 2 \rightarrow$ Sinergia

$SS > 1 \rightarrow$ Sinergia Débil

Tabla 1. Se indican los valores de CI_{50} absoluta de agente único para cada compuesto y medidas de puntuación de sinergia para la combinación de Compuesto 1 y paclitaxel. Las interacciones se consideraron sinérgicas cuando se observaron puntuaciones $\geq 2,0$.

Línea Celular	Linaje	Compuesto 1	Paclitaxel	Combinación
		CI_{50} absoluta (nM)	CI_{50} absoluta (nM)	Puntuación de Sinergia (SS)
BT-20	Mama	653	5,97	7,93
BT-474	Mama	1.262,5	1,7	4,7
BT-549	Mama	>10.000	8,82	9,01
Cal-148	Mama	1.330	4,25	13,8
HCC1143	Mama	>10.000	9,43	2,58
HCC1395	Mama	9.915	8,03	1,52
HCC1500	Mama	257,5	>1.000	6,38
HCC1937	Mama	137	11,6	9,4
HCC1954	Mama	158,5	6,5	3,69

Línea Celular	Linaje	Compuesto 1	Paclitaxel	Combinación
		CI ₅₀ absoluta (nM)	CI ₅₀ absoluta (nM)	Puntuación de Sinergia (SS)
HCC38	Mama	3.385	4,33	5,19
HCC70	Mama	704	8,39	11,9
Hs 578T	Mama	519,5	0,363	8,49
MCF7	Mama	1.292,5	10,4	3,82
MDA-MB-157	Mama	>10.000	>1.000	0,389
MDA-MB-231	Mama	>10.000	17,5	4,86
MDA-MB-436	Mama	>10.000	14,7	1,41
MDA-MB-453	Mama	>10.000	4,2	23,9
MDA-MB-468	Mama	9.917,5	3,07	11,3
SK-BR-3	Mama	301	2,66	4,52
NCI-H522	Pulmón	713	0,48	14,9
NCI-H23	Pulmón	160	0,22	6,97
A549	Pulmón	>10.000	0,163	4,82

Resultados

El Compuesto 1 como agente único inhibió el crecimiento de 7/19 líneas celulares de cáncer de mama y 2/3 líneas celulares de cáncer de pulmón, con CI₅₀ por debajo de 1.000 nM (Tabla 1).

- 5 El paclitaxel como agente único inhibió el crecimiento de 17/19 líneas celulares de cáncer de mama y 3/3 líneas celulares de cáncer de pulmón, con CI₅₀ por debajo de 1.000 nM.

En combinación, el tratamiento con el Compuesto 1 y paclitaxel causó una inhibición sinérgica del crecimiento (es decir, Puntuaciones de Sinergia por encima de 2 (Lehar et al, 2009)) en 16/19 líneas celulares de cáncer de mama y 3/3 líneas celulares de cáncer de pulmón (Tabla 1). En 11 líneas celulares, el efecto de sinergia fue marcado, con

puntuaciones de sinergia por encima de 6. De forma importante, la sinergia no fue dependiente de los efectos anti-proliferativos del agente único, y los efectos sinérgicos ocurrieron en un amplio intervalo de concentraciones de agente único (Figuras 1, 2 y 3), lo que se demostraría beneficioso *in vivo* respecto a la flexibilidad referida a los niveles y esquema de dosificación.

EJEMPLO 2: Efecto *in vitro* en la proliferación de la combinación de inhibidor de MCL-1 (Compuesto 2) con paclitaxel en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón

El efecto en la proliferación de la combinación de inhibidor de MCL-1 (Compuesto 2) con paclitaxel se evaluó en un panel de 2 líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-453 y MDA-MB-468) y una línea celular de cáncer de pulmón (H522).

Material y método

Las líneas celulares se proporcionaron y mantuvieron en el medio básico suplementado con suero fetal bovino como se indica en la Tabla 2. Además, todos los medios contenían penicilina (100 IU/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y L-glutamina (2 mM).

Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO₂ y se expandieron en matraces T-150. En todos los casos, las células se descongelaron de preparaciones madre congeladas, se expandieron a través de ≥ 1 subcultivo usando diluciones apropiadas, se contaron y se evaluaron para viabilidad usando un contador celular CASY antes de plaquear 150 µl/pocillo a las densidades indicadas en la Tabla 2 en placas de 96 pocillos. Se determinó que todas las líneas celulares carecían de contaminación por micoplasma *in situ*.

Las disoluciones madre de los compuestos se prepararon a una concentración de 5 mM en DMSO y se almacenaron a -20°C.

Con el fin de analizar la actividad de los compuestos como agente único o en combinación, las células se sembraron y se trataron con siete u ocho diluciones seriadas de 3,16 veces de cada compuesto dispensado, bien individualmente o en todas las posibles permutaciones en forma de damero, directamente en las placas de ensayo de células como se indica en las Figuras 5 y 6. Los efectos de los agentes únicos así como de sus combinaciones en damero en la viabilidad celular se evaluaron después de 3 días de incubación a 37°C/5% CO₂ por cuantificación de los niveles de ATP celular usando CellTiterGlo a 75 µL de reactivo/pocillo. Se realizaron al menos dos experimentos independientes, cada uno realizado en duplicado. La luminiscencia se cuantificó en un lector de placas multipropósito.

Las CI₅₀ de agente único se calcularon usando ajuste de curva estándar de cuatro parámetros. Las interacciones sinérgicas potenciales entre combinaciones de compuestos se evaluaron usando la matriz 2D de Inhibición en Exceso según el modelo de aditividad de Loewe y se reportan como Puntuación de Sinergia (Lehar et al. 2009). Todos los cálculos se realizaron usando Software ClaliceTM Bioinformatics disponible en el sitio de internet de Horizon.

El tiempo de duplicación indicado en la Tabla 2 es la media del tiempo de duplicación obtenido en los diferentes subcultivos (en matraces T-150) realizados desde la descongelación de las células hasta su siembra en las placas de 96 pocillos.

Puntuación de Sinergia

SS ~ 0 → Aditivo

SS >1 → Sinergia Débil

SS >2 → Sinergia

Tabla 2. Identidad y condiciones de ensayo para las líneas celulares usadas en los experimentos de combinación.

Línea Celular	Linaje	Medio	%FBS	Fuente	Tiempo de duplicación (horas)	Número de células sembradas/pocillo
MDA-MB-453	Mama	L-15	10	ATCC	41,4	15.000
MDA-MB-468	Mama	L-15	20	ATCC	34,3	30.000
H522	Pulmón	RPMI	10	ATCC	67,2	30.000

Tabla 3. Se indican los valores de CI_{50} de agente único para el Compuesto 2 y paclitaxel. Los compuestos se incubaron con las células durante 3 días.

Línea Celular	Compuesto 2		Paclitaxel	
	Conc. de partida $[\mu M]$	CI_{50} $[\mu M]$	Conc. de partida $[\mu M]$	CI_{50} $[\mu M]$
MDA-MB-453	2,00	> 2	1,0	> 1
MDA-MB-468	2,00	> 2	1,0	0,0009
H522	2,00	0,140	0,01	0,0002

Tabla 4. Se indican las puntuaciones de sinergia para la combinación de Compuesto 2 y paclitaxel. Las interacciones se consideraron sinérgicas cuando se observaron puntuaciones $\geq 2,0$. Se indican las concentraciones de partida de los compuestos, media de inhibición máxima y la desviación estándar (sd) de las puntuaciones de sinergia. Los compuestos se incubaron con las células durante 3 días.

Línea Celular	Compuesto 2		Paclitaxel		Combinación	
	Conc. de partida [μM]	Media de Inh Máx [%]	Conc. de partida [μM]	Media de Inh Máx [%]	Media de Puntuación de Sinergia (SS)	Error de la Puntuación de Sinergia (sd)
MDA-MB-453	2,0	21,0	1,00	37,0	16,9	0,5
MDA-MB-468	2,0	24,0	1,00	75,0	6,5	0,2
H522	2,0	92,0	0,01	61,0	3,7	0,6

Resultados

El Compuesto 2 como agente único inhibió el crecimiento de 1/3 de las líneas celulares ensayadas, con CI_{50} de 140 nM para la línea celular H522 (Tabla 3).

El paclitaxel como agente único inhibió el crecimiento de 2/3 de las líneas ensayadas, con CI_{50} por debajo de 1 nM.

En combinación, el tratamiento con el Compuesto 2 y paclitaxel causó inhibición sinérgica del crecimiento (es decir, Puntuaciones de Sinergia por encima de 2 (Lehar et al. 2009)) en las tres líneas celulares ensayadas (Tabla 4). En 2 líneas celulares, el efecto de sinergia fue marcado, con puntuaciones de sinergia de 6,5 y 16,9. De forma importante, la sinergia no fue dependiente de los efectos anti-proliferativos del agente único, y los efectos sinérgicos ocurrieron en un amplio intervalo de concentraciones de agente único (Figuras 4 y 5), lo que se demostraría beneficioso *in vivo* respecto a la flexibilidad referida a los niveles y esquema de dosificación.

EJEMPLO 3: Sinergia entre el inhibidor de MCL-1 y docetaxel *in vitro*

Investigamos si el inhibidor de MCL-1 (Compuesto 2) incitaba una actividad sinérgica con agentes usados actualmente en el tratamiento de TNBC. El Compuesto 2 se combinó con docetaxel en células SK-BR-3.

Material y método

5 *Líneas Celulares:* La línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 se mantuvo en RPMI-1640 más GlutaMAX-1 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS) y 10 µg/ml de insulina. Para los ensayos de viabilidad, las células se plaquearon a 2×10^5 células/ml en placas de 96 pocillos, en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de FCS y 10 µg/ml de insulina, y se trataron con concentraciones crecientes de
10 Compuesto 2.

Viabilidad Celular: La viabilidad celular se evaluó usando el Ensayo Luminiscente Cell Titer Glo (Promega) según las instrucciones del fabricante. El inhibidor de caspasa de amplio espectro QVD-OPh hidrato (Sigma-Aldrich) se usó a 10 µM. La exclusión de yoduro de propidio (5 µg/ml) se analizó por citometría de flujo. Para los ensayos en células
15 *in vitro* para abordar la sinergia entre diferentes fármacos, los efectos de la combinación se determinaron usando el método de independencia de Bliss (Prichard et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1991, 35, 1060-5).

Resultados

El docetaxel y los inhibidores de MCL-1 mostraron una sinergia marcada a
20 concentraciones muy bajas de ambos componentes. Particularmente, el docetaxel y el Compuesto 2 mostraron sinergia marcada a concentraciones muy bajas de docetaxel (2 nM) y Compuesto 2 (31 nM) (Figuras 6 y 7). La inhibición de caspasas con el inhibidor de caspasa general QVD-OPH bloqueó eficientemente la muerte celular, confirmando que la muerte celular se desencadenaba a través de apoptosis (Figura 6).

EJEMPLO 4: La inhibición de MCL-1 sensibiliza a tumores PDX frente a tratamiento con taxano *in vivo*

Como los ensayos *in vitro* revelaron que las líneas celulares de cáncer de mama eran sensibles a Compuesto 2 en terapia de combinación, determinamos a continuación su efecto terapéutico *in vivo* en tres modelos de PDX, que representan tres TNBC (110T, 838T y PDX OD-BRE-0589).

Material y método

Los tejidos de cáncer de mama humanos se obtuvieron de pacientes que otorgaron consentimiento a través del Banco de Tejidos del Royal Melbourne Hospital, el Victorian Cancer Biobank y Georges-Francois Leclerc Center con la aprobación del panel de revisión institucional relevante. La aprobación de Ética Humana se obtuvo del Comité de Ética en Investigación Humana de Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) y del Comité de Ética en Investigación Humana de Georges-Francois Leclerc Center. Los ratones NOD SCID con inactivación en el receptor gamma de IL2 o ratones SCID se criaron y mantuvieron según las directrices institucionales. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de WEHI y Servier Research Institute (IdRS).

El Compuesto 2 (25 mg/kg) o su vehículo se inyectó i.v. semanalmente durante seis semanas. El Compuesto 2 se disolvió en 20% (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina y 25 mM de ácido clorhídrico. El docetaxel (10 mg/kg i.p.) o su vehículo se preparó como se ha descrito previamente (Oakes et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2012, 109, 2766-71) y se inyectó i.p. semanalmente un día antes del Compuesto 2. Los ratones se monitorizaron para el desarrollo de tumor tres veces a la semana y el tamaño tumoral se midió usando calibradores vernier electrónicos. El volumen tumoral se estimó midiendo los diámetros tumorales mínimo y máximo usando la fórmula: (diámetro mínimo)²(diámetro máximo)/2. Una vez surgieron los tumores, los ratones se aleatorizaron en brazos de tratamiento. El tratamiento se inició cuando el volumen tumoral alcanzó 80-120 mm³. La aleatorización y mediciones tumorales se gestionaron usando el software Study Director (v 3.0, studylog). Los ratones se sacrificaron en la primera medición para la

que el volumen tumoral superó los 600 mm³ o deterioro de la salud del animal que no se debe a progresión de la enfermedad o toxicidad del fármaco (ratones censurados).

Resultados

El Compuesto 2 solo fue insuficiente para inhibir el crecimiento tumoral. Sin embargo, observamos una actividad superior en combinación con docetaxel comparado con docetaxel administrado como un agente único, resultando en una supervivencia animal significativamente mejorada en los tres modelos de PDX (Figura 8).

Estos resultados indican que los inhibidores de MCL-1 combinados con compuestos taxano probablemente aumenten significativamente la respuesta tumoral y el resultado clínico.

EJEMPLO 5: El inhibidor de MCL-1 combinado con docetaxel se tolera bien *in vivo*

Los ratones NOD SCID con receptor gamma de IL2 inactivado se trataron con docetaxel (15 mg/kg, una vez i.p.) y Compuesto 2 a 25 ó 50 mg/kg (3 ratones por grupo, inyecciones i.v., una vez a la semana durante 3 semanas). Su peso corporal se monitorizó tres veces a la semana durante 3 semanas.

El Compuesto 2 combinado con docetaxel se toleró bien y no produjo pérdida de peso corporal significativa (Figura 9).

EJEMPLO 6: Eficacia del Compuesto 1 en combinación con paclitaxel en el modelo de xenoinjerto de mama MDA-MB-231 en ratas desnudas

Métodos

Este estudio evaluó la actividad antitumoral y tolerabilidad del Compuesto 1 en combinación con paclitaxel en el modelo de cáncer de mama triple negativo (TNBC), MDA-MB-231, en ratas hembras desnudas NTac:NIH-W_hn (Taconic).

El Compuesto 1 (base libre) y paclitaxel (Sandoz) se usaron en estos estudios. El paclitaxel se diluyó según las instrucciones del fabricante con disolución de glucosa estéril al 5%

(p/v) hasta 1,5 mg/ml para administrar 7,5 mg/kg en un volumen de dosis de 5 ml/kg [la concentración final de etanol y Cremophor EL fue 10 y 15%, respectivamente en disolución de glucosa al 5% (p/v)]. El Compuesto 1 se formuló en una formulación liposomal (Novartis) a 5 mg/ml para administrar una dosis de 50 mg/kg en 10 ml/kg de volumen de dosis.

MDA-MB-231, una línea celular de cáncer de mama triple negativo, se obtuvo del banco de células ATCC. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en aire en medio DMEM con alta glucosa (BioConcept Ltd. Amimed) suplementado con 10% FCS (BioConcept Ltd. Amimed, # 2-01F36-I) y 4 mM L-glutamina (BioConcept Ltd. Amimed, #5-10K00-H). Para establecer xenoinjertos MDA-MB-231, las células se recogieron y re-suspendieron en HBSS (Gibco, #14175) y se mezclaron con Matrigel (BD Bioscience, #354234) (1:1 v/v) antes de inyectar 200 µL que contenían 1 x 10⁷ células subcutáneamente en los flancos derechos de animales que fueron anestesiados con isoflurano. Veinticuatro horas antes de la inoculación de las células, todos los animales fueron irradiados con 5 Gy durante 2 minutos usando un irradiador γ.

El crecimiento tumoral se monitorizó regularmente después de la inoculación de las células y los animales se aleatorizaron en grupos de tratamiento (n = 7-8) con un volumen tumoral medio de aproximadamente 400 mm³. Los grupos se trataron con:

- 1) el vehículo usado para formular paclitaxel, iv más vehículo liposomal iv; o
- 2) 7,5 mg/kg bolo iv de paclitaxel más vehículo liposomal iv; o
- 3) el vehículo usado para formular paclitaxel iv más Compuesto 1 a 50 mg/kg iv; o
- 4) 7,5 mg/kg iv de paclitaxel más 50 mg/kg iv de Compuesto 1.

El vehículo para paclitaxel o paclitaxel se administró una vez a la semana (QW) como una dosis en bolo lento a través de una vena caudal 0,5 h ó 16 h antes del vehículo para el Compuesto 1 o Compuesto 1 en sí mismo en formulación liposomal y éstos se administraron por infusión iv durante 15 minutos en una vena caudal. Para las administraciones en bolo e infusiones de 15 minutos, los animales fueron anestesiados durante aproximadamente 5 y 25 minutos, respectivamente con isoflurano/O₂.

Los volúmenes tumorales se midieron usando calibradores 2-3 veces a la semana. El tamaño tumoral, en mm³, se calculó a partir de: $(L \times W^2 \times \pi/6)$, donde W = anchura y L = longitud del tumor. Los animales también se pesaron 2-3 veces a la semana y se examinaron frecuentemente para signos manifiestos de cualesquiera efectos adversos.

Los datos del tumor y cambio en el peso corporal se analizaron estadísticamente usando GraphPad Prism 7.00 (Software GraphPad). Si las varianzas en los datos se distribuían normalmente, los datos se analizaron usando ANOVA de una vía con ensayo post hoc de Dunnett para comparación de grupo de tratamiento frente a control. El ensayo post hoc de Tukey se usó para comparación intragrupo. De otra forma, se usó el ensayo de rangos de Kruskal-Wallis post hoc de Dunn. Cuando sea aplicable, los resultados se presentan como media $\pm$ SEM.

Como una medida de eficacia, se calcula el valor %T/C al final del experimento según:

$$(\Delta \text{volumen tumoral}^{\text{tratado}} / \Delta \text{volumen tumoral}^{\text{control}}) * 100$$

La regresión tumoral se calculó según:

$$-(\Delta \text{volumen tumoral}^{\text{tratado}} / \text{volumen tumoral}^{\text{tratado al inicio}}) * 100$$

donde Δ volúmenes tumorales representan el volumen tumoral medio en el día de la evaluación menos el volumen tumoral medio al inicio del experimento.

Resultados: eficacia y tolerabilidad

El Compuesto 1 50 mg/kg dosificado 0,5 h ó 16 h después del vehículo para paclitaxel [etanol : Cremophor EL : glucosa al 5% (p/v) (10 : 15 : 75%)] se tolera bien.

El Compuesto 1 (50 mg/kg QW) en formulación liposomal no presentó eficacia en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 después de administración por infusión iv QWx7 (Figuras 10 y 12).

El paclitaxel 7,5 mg/kg causó retraso en el crecimiento tumoral (T/C% = 34%) y fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del grupo tratado con vehículo (Figuras 10 y 12).

La combinación de 7,5 mg/kg iv de paclitaxel más 50 mg/kg iv de Compuesto 1 administrada con una separación de 0,5 h ó 16 h causó 82 y 59% de regresión, respectivamente, en el día 28 después del inicio del tratamiento en los animales supervivientes (3/8 en ambos grupos) (Figura 10). En el día 46 desde el inicio del tratamiento, la regresión tumoral fue 92 y 81%, en los animales supervivientes 2/8 y 3/8, respectivamente. El volumen tumoral en los animales de ambos de estos grupos de combinación fue significativamente diferente ($p < 0,05$) del presente en los animales tratados con paclitaxel o Compuesto 1 solo en el día 28 y 46 (Figura 10).

La combinación de 7,5 mg/kg iv de paclitaxel más 25 mg/kg iv de Compuesto 1 administrada con una separación de 16 h causó estasis tumoral (15% de regresión en el día 28 y los valores de T/C% fueron 2% en el día 49 después del inicio del tratamiento) en los animales supervivientes (7/7) (Figura 12). Este esquema de dosis se toleró bien sobre la base de cambios en el peso corporal y signos clínicos.

La combinación de 3,75 mg/kg iv de paclitaxel más 50 mg/kg iv de Compuesto 1 administrada con una separación de 16 h causó estasis tumoral hasta el día 35 (3% de regresión en el día 28 y los valores de T/C% fueron 20% en el día 49 después del inicio del tratamiento) en los animales supervivientes (7/7) (Figura 12). Este esquema de dosis se toleró bien sobre la base de cambios en el peso corporal y signos clínicos (Figuras 11 y 13). Estos datos indican que la combinación de paclitaxel y Compuesto 1 tiene un efecto positivo marcado en la actividad antitumoral comparado con cualquiera de los agentes solos.

EJEMPLO 7: La inhibición de MCL-1 sensibiliza a tumores PDX frente a tratamiento con taxano *in vivo*

Determinamos el efecto terapéutico *in vivo* del Compuesto 1 en terapia de combinación, en el modelo TNBC 110T PDX.

Material y método

Los tejidos de cáncer de mama humanos se obtuvieron de pacientes que otorgaron consentimiento a través del Banco de Tejidos del Royal Melbourne Hospital, el Victorian Cancer Biobank y Georges-Francois Leclerc Center con la aprobación del panel de revisión institucional relevante. La aprobación de Ética Humana se obtuvo del Comité de Ética en Investigación Humana de Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) y del Comité de Ética en Investigación Humana de Georges-Francois Leclerc Center. Los ratones NOD SCID con inactivación en el receptor gamma de IL2 o ratones SCID se criaron y mantuvieron según las directrices institucionales. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de WEHI y Servier Research Institute (IdRS).

Una cohorte de 40 ratones hembras NSG se sembraron con suspensiones de células únicas descongeladas de tumores de mama humanos de los primeros subcultivos (TNBC PDX110). Brevemente, se resuspendieron 100.000 células en 10 µl de tampón de trasplante (50% suero fetal de ternera, 10% de una disolución de azul de tripán al 0,04% y 40% PBS) y Matrigel con factor de crecimiento reducido [BD] a una proporción de 3:1, y se inyectaron en las almohadillas adiposas mamarias aclaradas de ratones hembras NOD-SCID-IL2R $\gamma_c^{-/-}$ de 3 ó 4 semanas de edad. Los ratones se monitorizaron para el desarrollo de tumor tres veces a la semana y el tamaño tumoral se midió usando calibradores vernier electrónicos. El volumen tumoral se estimó midiendo los diámetros tumorales mínimo y máximo usando la fórmula: (diámetro mínimo)²(diámetro máximo)/2. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 60-110 mm³, los ratones se aleatorizaron en brazos de tratamiento y comenzó el tratamiento. El docetaxel o su vehículo se preparó disolviendo una disolución madre (20 mg/ml) con PBS y se inyectó i.p. cada 21 días durante dos ciclos de tratamiento. La duración de la terapia se indica por la barra. El Compuesto 1 se disolvió en 20% (2-Hidroxipropil)- β -ciclodextrina y 25 mM ácido clorhídrico. El Compuesto 1 (15 mg/kg) o su vehículo se inyectó i.v. dos veces semanalmente durante seis semanas. Los ratones se sacrificaron en la primera medición donde el volumen tumoral superó los 600 mm³, o si su salud se deterioró por razones distintas de progresión de la enfermedad o toxicidad del fármaco (evento censurado). n = 9-10 ratones por grupo de tratamiento.

Resultados

El Compuesto 1 solo fue insuficiente para inhibir el crecimiento tumoral. Sin embargo, observamos una actividad superior en combinación con docetaxel comparado con docetaxel administrado como un agente único, resultando en una supervivencia animal significativamente mejorada en el modelo de PDX (Figura 14).

Estos resultados indican que los inhibidores de MCL-1 combinados con compuestos taxano probablemente aumenten significativamente la respuesta tumoral y el resultado clínico.

EJEMPLO 8: Actividad antitumoral de docetaxel y Compuesto 1 en ratones hembras SCID que portan modelo de TNBC derivado de paciente

Este estudio evaluó la actividad antitumoral del Compuesto 1 en combinación con docetaxel en un modelo de TNBC PDX OD-BRE-00589, en ratones hembras SCID.

5 **Métodos**

El docetaxel se formuló en 5% etanol, 5% PS80 y 90% Glucosa a 0,67 mg/ml para administrar 10 mg/kg. El Compuesto 1 se formuló en una formulación liposomal (Novartis) a 7,5 mg/ml para administrar 70 mg/kg.

10 OD-BRE-00589 es un PDX de cáncer de mama triple negativo, obtenido del consorcio IMODI. El consentimiento de pacientes se obtuvo del Comité de Ética en Investigación Humana de Georges-Francois Leclerc Center. Se injertó en ratones SCID como fragmentos de un volumen de 27 mm³.

15 El crecimiento tumoral se monitorizó regularmente después del injerto de los fragmentos y los animales se aleatorizaron 11 días después del injerto en grupos de tratamiento (n = 8) con un volumen tumoral medio de aproximadamente 200 mm³. El grupo control no se trató y los demás grupos se trataron con:

- 1) 70 mg/kg de Compuesto 1 iv, o
- 2) 10 mg/kg de docetaxel iv, o
- 3) 10 mg/kg de docetaxel iv seguido de 30 min después con 70 mg/kg de
- 20 Compuesto 1, o
- 4) 10 mg/kg de docetaxel iv seguido de 72h después con 70 mg/kg de Compuesto 1.

Las administraciones se realizaron una vez en la vena caudal.

25 Los volúmenes tumorales se midieron usando calibradores 2-3 veces a la semana. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: longitud x anchura²/2. Los animales también se pesaron 2-3 veces a la semana y se examinaron frecuentemente para signos manifiestos de cualesquiera efectos adversos.

Resultados

El Compuesto 1 solo fue insuficiente para inhibir el crecimiento tumoral. Sin embargo, observamos una actividad superior en combinación con docetaxel comparado con

docetaxel administrado como un agente único, resultando en una actividad antitumoral significativamente mejorada en el modelo de PDX (Figura 15).

Estos resultados indican que los inhibidores de MCL-1 combinados con compuestos taxano probablemente aumenten significativamente la respuesta tumoral y el resultado clínico.

EJEMPLO 9: Estudios de eficacia del Compuesto 1 combinado con paclitaxel en modelos de PDX resistentes a docetaxel

Métodos

Se ensayaron modelos de PDX cuya resistencia a docetaxel se ha confirmado *in vivo*. Cada grupo de tratamiento incluyó 5 ratones hembras Swiss desnudos, con edades de 6 a 8 semanas. El tratamiento empezó cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen tumoral medio de $\sim 120\text{-}150\text{ mm}^3$. Los grupos de ratones se asignaron aleatoriamente entonces a los diferentes tratamientos. El número de animales injertados dependió de la homogeneidad del crecimiento tumoral.

Formulado en una formulación liposomal, el Compuesto 1 se administró intravenosamente a 70 mg/kg una vez a la semana. La formulación tenía que prepararse extemporáneamente. El paclitaxel diluido en NaCl al 0,9% se proporcionó ip a 25 mg/kg. El paclitaxel se proporcionó QW 16 horas antes de la administración del Compuesto 1. El esquema de administración de los diferentes tratamientos se define como sigue:

Grupo	Dosis (mg/kg)	Esquema
Control (vehículo)	-	-
Compuesto 1	70	IV, Q7D, 4w: D1-D8-D15-D22
Paclitaxel	25	IP, Q7D, 4w: D1-D8-D15-D22
Compuesto 1 + paclitaxel	Compuesto 1: 70 Paclitaxel: 25	Q7D, 4w Paclitaxel, IP: D1-D8-D15-D22 Compuesto 1, IV: D1-D8-D15-D22

Los tamaños tumorales se midieron dos veces a la semana y los pesos de ratones

individuales se midieron una vez a la semana. Los tratamientos se hicieron hasta que el volumen tumoral medio del grupo con mayor respuesta empezó a crecer de nuevo. Los ratones se siguieron después de la parada del tratamiento para comparar el tiempo hasta recidiva entre los grupos. Usando software Statview, se compararon el volumen tumoral y/o volumen tumoral relativo (RTV, proporción del volumen en el tiempo t dividido por el volumen inicial en el día 1 y multiplicado por 100), inhibición óptima del crecimiento (proporción de RTV (x 100) en el grupo tratado dividido por la RTV en los controles), retraso del crecimiento (el tiempo en días necesario para multiplicar por 4 un volumen tumoral inicial de 200 mm³ en el grupo tratado y grupo control) y cambio en el peso corporal.

Si se observó recidiva después de tratamiento con paclitaxel, los tumores se volvieron a pulsar con la combinación de Compuesto 1 + paclitaxel. Esto se hizo bien incluyendo 10 ratones en el grupo tratado con paclitaxel y después tratando ratones con recidiva tumoral con paclitaxel solo (5 animales) o en combinación (5 animales), o usando ratones no aleatorizados del estudio de eficacia. Si se observó respuesta inicial a paclitaxel, se incluyeron para este estudio animales adicionales dejados después de la aleatorización.

Resultados

El Compuesto 1 solo fue insuficiente para inhibir el crecimiento tumoral. Sin embargo, observamos una actividad superior en combinación con paclitaxel comparado con paclitaxel administrado como un agente único, resultando en una actividad antitumoral significativamente mejorada en el modelo de PDX resistente a un compuesto taxano.

Estos resultados indican que los inhibidores de MCL-1 combinados con compuestos taxano probablemente aumenten significativamente la respuesta tumoral y el resultado clínico.