

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 279**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2018 PCT/EP2018/069901**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019 WO19020559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2018 E 18740615 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021 EP 3658147**

54 Título: **Combinación que comprende palbociclib y ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico y su uso para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

24.07.2017 US 201762536121 P
25.07.2017 EP 17305998

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2022

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

BOUABOULA, MONSIF;
SHOMALI, MAYSOUN y
SUN, FANGXIAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 906 279 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinación que comprende palbociclib y ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico y su uso para el tratamiento del cáncer

5 Se proporcionan en la presente una combinación de palbociclib y de ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico, una composición farmacéutica que contiene esta combinación y los usos terapéuticos de esta combinación y composición farmacéutica, en particular para el tratamiento del cáncer.

10 El receptor estrogénico α (ESR1) se expresa en la mayoría de los tumores de mama, permitiéndolos responder a las acciones mitogénicas de los estrógenos.

15 El ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico, posteriormente denominado en la presente "compuesto (1)", es un degradante de receptores estrogénicos selectivo (SERD) que tiene propiedades antagonistas de receptores estrogénicos y acelera la degradación proteasómica del receptor estrogénico. Este compuesto se divulga en la solicitud de patente PCT/EP2017/053282, publicada como WO 2017/140669.

20 El palbociclib, también conocido como 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-[5-(1-piperacil)piridin-2-ilamino]pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona, es un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK) 4 y 6. El palbociclib se comercializa bajo el nombre comercial Ibrance[®] y está indicado para el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado o metastásico positivo a receptor hormonal (HR), negativo a receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), en combinación con un inhibidor de aromataza, o en combinación con fulvestrant en mujeres que hayan recibido terapia endocrina previa. En mujeres pre- o perimenopáusicas, la terapia endocrina se debe combinar con un agonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH).

25 El documento CN 106 924 210 A divulga el uso de palbociclib para tratar el cáncer de mama.

30 El documento WO 2016/176666 A1 divulga la combinación de palbociclib con el SERD fulvestrant para tratar a pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico ER+, HER2- que hayan progresado con una terapia endocrina anterior.

35 Siempre existe una necesidad de encontrar nuevos tratamientos antitumorales. Se ha encontrado ahora que una combinación del compuesto (1) con palbociclib es bien tolerada, demuestra una fuerte eficacia antitumoral e induce la regresión del tumor, con un efecto sinérgico en comparación con cada uno de los ingredientes activos solo.

Se proporciona en la presente una combinación que comprende el compuesto (1) y palbociclib.

40 En la combinación proporcionada en la presente, el compuesto (1) puede existir no solo en la forma de un ion dipolar (es decir una molécula globalmente neutra que tiene un grupo ácido y un grupo básico), sino también en la forma de sales por adición con ácidos o bases. Estas sales por adición se pueden usar en la combinación anterior. De ahí que se proporcione en la presente una combinación que comprende el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib.

45 En una realización, la combinación de compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, con palbociclib muestra sinergia terapéutica. Una combinación demuestra sinergia terapéutica si su efecto terapéutico es superior en comparación con el efecto acumulativo de cualquier agente activo de la combinación solo.

50 En otra realización, el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib se administran mediante la vía oral.

El presente texto también describe una combinación de compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib para su uso como un medicamento.

55 También se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib, así como al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Los excipientes se seleccionan de los excipientes habituales que son conocidos para un experto en la técnica. Más particularmente, los excipientes se seleccionan de los útiles para la administración oral en cualquier forma (solución, dispersión o suspensión líquida, comprimidos, cápsulas o similares).

En otra realización, el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib se pueden administrar simultáneamente, separadamente o espaciadamente a lo largo de un período (administración

secuencial). Por lo tanto, la combinación proporcionada en la presente no se limita exclusivamente a la que se obtiene mediante la asociación física de los constituyentes en una sola composición farmacéutica, sino también a las que permiten una administración separada, que puede ser simultánea o estar separada (o "extendida") a lo largo del tiempo.

- 5 También se proporciona en la presente un estuche farmacéutico que comprende:
- (i) una primera composición farmacéutica que comprende el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;
 - (ii) una segunda composición farmacéutica que comprende palbociclib y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;

estando ambas composiciones farmacéuticas (i) y (ii) en compartimentos separados y estando destinadas a ser administradas independientemente, siendo cada administración con respecto a la otra simultánea, separada o extendida (secuencial) a lo largo del tiempo.

- 15 En las combinaciones, las composiciones farmacéuticas y el estuche farmacéutico descritos anteriormente, el compuesto (1) o su sal farmacéuticamente aceptable y el palbociclib están presentes ventajosamente en dosis eficaces, adaptadas considerando la patología tratada y la afección del paciente al que se administran. En particular, para el palbociclib, la dosis de partida recomendada para el tratamiento del cáncer para pacientes adultos es 125 mg una vez al día durante 21 días seguido por 7 días sin tratamiento, junto con la interrupción de la dosificación y/o
- 20 reducciones de la dosis basándose en la seguridad y la tolerabilidad individuales.

También se proporciona en la presente una combinación que comprende el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib, así como una composición farmacéutica y un estuche como los descritos anteriormente, para el uso en el tratamiento del cáncer.

- 25 También se proporciona en la presente el compuesto (1) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento del cáncer mediante la coadministración con palbociclib.

- 30 También se proporciona en la presente palbociclib para el uso en el tratamiento del cáncer mediante la coadministración con el compuesto (1) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, el cáncer es un cáncer dependiente de hormonas.

- 35 En otra realización, el cáncer es un cáncer dependiente de estrógenos, particularmente el cáncer es un cáncer dependiente del receptor estrogénico α .

En otra realización, el cáncer es resistente a un tratamiento antihormonal.

- 40 En otra realización, el cáncer es un cáncer con receptores estrogénicos silvestres.

En otra realización, el cáncer es un cáncer con función desregulada de receptores estrogénicos relacionada con, pero no limitada a, al menos una alteración epigenética y genética de receptores estrogénicos, tal como mutación, amplificación, variante de empalme.

- 45 En otra realización, el cáncer es un cáncer con receptores estrogénicos mutados.

En otra realización, las mutaciones de receptores estrogénicos pueden incluir, pero no se limitan a, mutaciones nuevas o conocidas tales como Leu536Arg, Tyr537Ser, Tyr537Asn o Asp538Gly.

- 50 En otra realización, el cáncer es un cáncer sensible a estrógenos.

En otra realización, el cáncer es cáncer de mama, más particularmente un cáncer de mama positivo a receptores estrogénicos (cáncer de mama positivo a ER α), o una de sus metástasis, tal como una metástasis cerebral.

- 55 El presente texto también describe un método para tratar las condiciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y una cantidad terapéuticamente eficaz de palbociclib.

- 60 El presente texto también describe un método para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica como la descrita anteriormente.

El presente texto también describe un método para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una combinación como la descrita anteriormente.

5 El presente texto también describe un método para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, que comprende coadministrar a un sujeto que lo necesite el compuesto (1) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y palbociclib.

10 El presente texto también describe un método para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, que comprende coadministrar a un sujeto que lo necesite palbociclib y el compuesto (1) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 En los métodos descritos anteriormente, el sujeto puede ser un ser humano.

El presente texto también describe una combinación que comprende el compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib para la fabricación de un medicamento útil para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama.

20 El presente texto también describe el uso del compuesto (1), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento útil para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, mediante la coadministración con palbociclib.

25 El presente texto también describe el uso de palbociclib en la fabricación de un medicamento útil para tratar las afecciones patológicas indicadas anteriormente, particularmente cáncer de mama, mediante la coadministración con el compuesto (1) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El presente texto también describe un artículo de fabricación, un envase o una unidad de administración, que comprende:

- 30
- un material de envasado;
 - la combinación, la composición farmacéutica o el estuche farmacéutico definidos anteriormente; y
 - una etiqueta o un prospecto contenido dentro de dicho material de envasado, que indica que dicha combinación, composición farmacéutica o estuche farmacéutico se administra a un paciente para el tratamiento del cáncer.

35 Los ejemplos posteriores muestran cómo sintetizar el compuesto (1), y los resultados farmacológicos obtenidos con el compuesto (1), palbociclib y su combinación contra un xenoinjerto de línea celular de cáncer de mama en ratones.

1 - Síntesis de ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico

40 El protocolo experimental para sintetizar ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico (compuesto (1)), descrito en la solicitud de patente WO 2017/140669, se reproduce posteriormente, junto con sus datos analíticos. El esquema sintético para la síntesis del compuesto (1) se encuentra en la Figura 1.

45 Los espectros de ¹H NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance DRX-400, con los desplazamientos químicos (δ en ppm) en el disolvente dimetilsulfóxido-d6 (d6-DMSO) con referencia a 2,5 ppm a una temperatura de 30°C (303 K). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en hertzios.

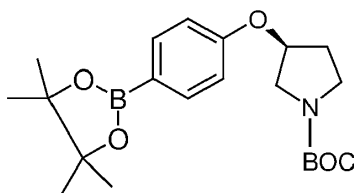
50 Los espectros de cromatografía de líquidos/masas (LC/MS) se obtuvieron en un instrumento UPLC Acquity Waters, un detector de dispersión de luz Sedere y un espectrómetro de masas SQD usando detección UV DAD 210<I>400 nm y una columna Acquity UPLC CSH C18 1.7 μm, dimensión 2,1×30 mm, fase móvil H₂O + 0,1% de HCO₂H / CH₃CN + 0,1% de HCO₂H.

Se usan las siguientes abreviaturas y fórmulas empíricas:

- 55 AcOEt acetato de etilo
- AlCl₃ tricloruro de aluminio
- 60 Cs₂CO₃ carbonato de cesio

	DCM	diclorometano
	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
5	DMSO	dimetilsulfóxido
	HCl	cloruro de hidrógeno
10	K ₂ CO ₃	carbonato potásico
	LC/MS	cromatografía de líquidos/espectrometría de masas
	MeOH	metanol
15	MgSO ₄	sulfato magnésico
	NaHCO ₃	bicarbonato sódico
20	NaOH	hidróxido sódico
	Pd(dppf)Cl ₂	1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II)
	Ph ₃ P o P(Ph) ₃	trifenilfosfina
25	Ph ₃ P=O	óxido de trifenilfosfina
	°C	grados Celsius
30	ml	mililitro(s)
	mmol	milimol(es)
	μmol	micromol(s)
35	μM	micromolar
	nM	nanomolar
40	ppm	partes por millón

Producto intermedio (c). (3S)-3-[4-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidino-1-carboxilato de terc-butilo

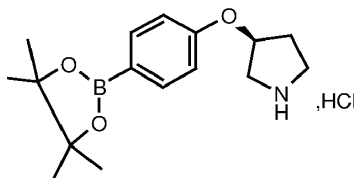


Se añadió bajo argón (R)-1-N-Boc-3-hidroxipirrolidina (**b**) (84,43 g, 437,41 mmol) seguida por *N,N,N',N'*-tetrametilazodicarboxamida (99,1 g, 546,77 mmol) a una solución de 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenol (**a**) disponible comercialmente (82,7 g, 364,51 mmol) en THF (2 l). La mezcla de reacción transparente se volvía naranja y se añadió trifenilfosfina (143,41 g, 546,77 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, mientras se formaba un precipitado de trifenilfosfina (Ph₃P=O). La mezcla de reacción se vertió en agua (1,5 l) y se extrajo con acetato de etilo (AcOEt) (3x1,5 l). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre sulfato magnésico (MgSO₄), se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se recogió en éter diisopropílico (1,5 l) y el sólido formado (Ph₃P=O) se filtró. El disolvente se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna eluyendo con una mezcla de heptano con AcOEt (90/10; v/v) para dar 145 g (100%) de (3S)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidino-1-carboxilato de terc-butilo (**c**) como un aceite incoloro.

55

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 1,27 (s : 12H); 1,39 (s : 9H); 2,05 (m : 1H); 2,14 (m : 1H); 3,37 (3H); 3,55 (m : 1H); 5,05 (s : 1H); 6,94 (d, J = 8,4 Hz : 2H); 7,61 (d, J = 8,4 Hz : 2H)

Producto intermedio (d). Hidrocloruro de (3S)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidina



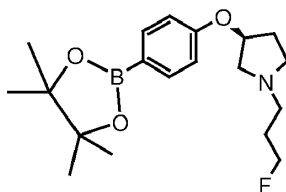
- 5 Se añadió lentamente HCl 4 N en dioxano (250 ml) a una solución de (S)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi)pirrolidino-1-carboxilato de terc-butilo (c) (80 g, 195,23 mmol) en MeOH (450 ml).

Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se recogió en Et₂O con agitación para dar un sólido que a continuación se filtró y se secó bajo vacío para dar 61,8 g (95%) de hidrocloruro de (3S)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidina (**d**) como un polvo blanco.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 1,28 (s : 12H); 2,10 (m : 1H); 2,21 (m : 1H); 3,31 (3H); 3,48 (m : 1H); 5,19 (m : 1H); 6,97 (d, J = 8,4 Hz : 2H); 7,63 (d, J = 8,4 Hz : 2H); 9,48 (s : 1H); 9,71 (s : 1H).

15 LC/MS (m/z, MH⁺): 290

Producto intermedio (e). (3S)-1-(3-Fluoropropil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidina

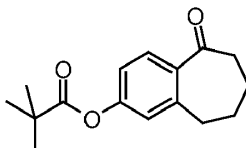


20 Se añadieron K₂CO₃ (21,22 g, 153,54 mmol) y 1-yodo-3-fluoropropano (12,15 g, 61,42 mmol), bajo argón, a una suspensión de hidrocloruro de (S)-3-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi)pirrolidina (**d**) (20 g, 61,42 mmol) en acetonitrilo (100 ml). La mezcla de reacción se agitó a 40°C durante 24 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y se lavó con acetonitrilo. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo se recogió en DCM y el sólido formado se filtró y se lavó con DCM. El filtrado se concentró para dar 21,5 g (100%) de (3S)-1-(3-fluoropropil)-3-[4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidina (**e**) como una espuma amarilla.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 1,27 (s : 12H); 1,77 (m : 2H); 1,84 (m : 1H); 2,27 (m : 1H); 2,41 (m : 1H); 2,49 (2H); 2,62 (dd, J = 2,6 y 10,4Hz : 1H); 2,69 (m : 1H); 2,83 (dd, J = 6,2 y 10,4Hz : 1H); 4,47 (td, J = 6,2 y 47Hz : 2H); 4,99 (m : 1H); 6,77 (d, J = 8,4 Hz : 2H); 7,58 (d, J = 8,4 Hz : 2H).

30 LC/MS (m/z, MH⁺): 350

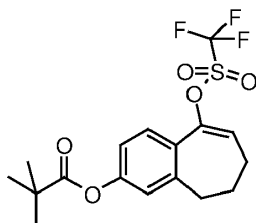
Producto intermedio (B). 2,2-Dimetilpropanoato de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anulen-2-ilo



35 Se añadieron K₂CO₃ (1,19 g, 8,63 mmol) y cloruro de pivaloilo (1,06 ml, 8,63 mmol) a una solución de 2-hidroxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anulen-5-ona (**A**) (1,52 g, 8,63 mmol), en acetona (60 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de heptano en AcOEt (de 100/0 a 85/15, v/v) para dar 1,55 g (69%) de 2,2-dimetilpropanoato de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anulen-2-ilo (B) como un aceite incoloro.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 7,65 (d, 1H); 7,10-7,04 (m, 2H); 2,95 (t, 2H); 2,68 (t, 2H); 1,85-1,65 (m, 4H).
LC/MS (m/z, MH^+): 261

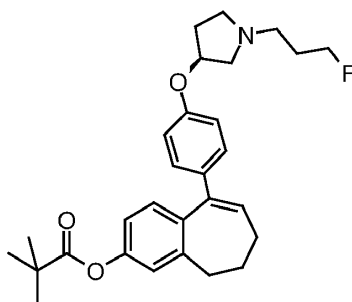
5 **Producto intermedio (C). 2,2-Dimetilpropanoato de 9-(trifluorometanosulfonilo)xi)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo**



10 Se añadieron gota a gota bajo argón piridina (7,28 ml, 86,43 mmol) y anhídrido trifluorometanosulfónico (19,58 ml, 115,24 mmol) a una solución de 2,2-dimetilpropanoato de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anulen-2-ilo (**B**) (15 g, 57,62 mmol) en DCM (500 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se añadió hielo (200 g). Las fases se separaron, la fase acuosa se lavó con DCM y las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida para dar 22 g (97%) de 2,2-dimetilpropanoato de 9-(trifluorometanosulfonilo)xi)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo (**C**) como un sólido blanco.

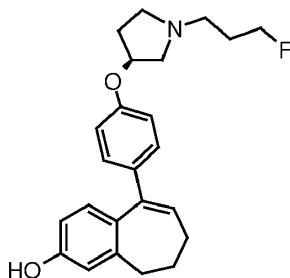
LC/MS (m/z, MH^+): 391

15 **Producto intermedio (D). 2,2-Dimetilpropanoato de 9-(4-(((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxi)fenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo**



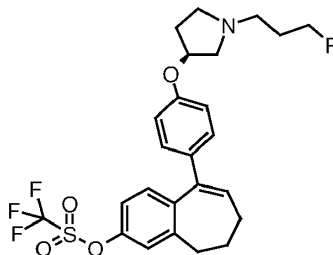
20 Se añadieron bajo argón $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (2,75 g, 3,36 mmol) y Cs_2CO_3 (36,57 g, 112,13 mmol) a una solución de 2,2-dimetilpropanoato de 9-(trifluorometanosulfonilo)xi)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo (**C**) (22 g, 56,07 mmol) y (3S)-1-(3-fluoropropil)-3-[4-(tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidina (**e**) (20,56 g, 58,87 mmol) en dioxano (420 ml) y agua (120 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se repartió entre agua y DCM. La fase acuosa se lavó con DCM y las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna eluyendo con un gradiente de MeOH en DCM (de 0 a 5%; V/V) para dar 31 g (100 %) de 2,2-dimetilpropanoato de 9-(4-(((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxi)fenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo (**D**).

25 LC/MS (m/z, MH^+): 466

Producto intermedio (E). 9-(4-1-((3S)-1-(3-Fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ol

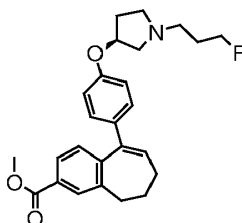
Se añadió NaOH 5 M (23 ml, 115,00 mmol) a una solución bajo argón de 2,2-dimetilpropanoato de 9-(4-1-((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo (D) (24,8 g, 53,26 mmol) en MeOH (300 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, el pH se ajustó hasta 7 mediante la adición de solución acuosa de HCl 6 N. El MeOH se concentró bajo presión reducida, a continuación se añadió DCM. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH de 100/0 a 95/05 para dar 18,8 g (93%) de 9-(4-1-((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ol (E) como un sólido beige.

LC/MS (m/z, MH^+): 382

Producto intermedio (F). Trifluorometanosulfonato de 9-(4-1-((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo

Se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (18,93 ml, 108,00 mmol) bajo argón a una solución de 9-(4-1-((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ol (E) (20,6 g, 54,00 mmol) en DCM (200 ml) y piridina (6,55 ml, 81,00 mmol), se enfrió hasta 5°C (baño de hielo) y la temperatura de reacción se mantuvo <15°C. El baño de hielo se retiró y la suspensión parda se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron hielo (200 g) y DCM (200 ml) y las fases se separaron. La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH de 100/0 a 95/05 para dar 24,7 g (89,1%) de trifluorometanosulfonato de 9-(4-1-((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo (F) como un aceite pardo.

LC/MS (m/z, MH^+): 514

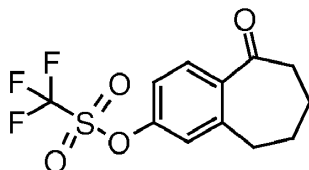
Producto intermedio (G). 9-(4-1-((3S)-1-(3-Fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo

Se añadieron $Pd(dppf)Cl_2$ (909 mg, 1,18 mmol) y diisopropiletilamina (7,21 ml) a una solución de trifluorometanosulfonato de 9-(4-1-((3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il)oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anulen-3-ilo (F) (10,1 g, 19,67 mmol) en DMF (66 ml) y MeOH (33 ml). La suspensión negra se carboniló en una autoclave a 70°C

bajo 5 bares de CO durante 5 horas. La mezcla de reacción se filtró y a continuación el filtrado se concentró parcialmente bajo presión reducida. El residuo se repartió entre AcOEt y agua. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 100 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH de 100/0 a 95/05 para dar 7,13 g (86%) de 9-(4-
5-[[[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxi]fenil]-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**G**) como una goma parda.

LC/MS (m/z, MH⁺): 424

Producto intermedio (A1). Trifluorometanosulfonato de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-2-ilo

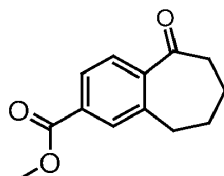


10 Se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (20,22 ml, 123,29 mmol) mientras se mantenía la temperatura entre 10 y 20°C a una solución de 2-hidroxi-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-5-ona (**A**) disponible comercialmente (18,5 g, 105 mmol) en DCM (185 ml) y lutidina (13,35 ml, 113,505 mmol), enfriada a 5°C bajo argón. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 5°C y a continuación a temperatura ambiente durante 1 hora.

15 A continuación, se añadió hielo (200 g) y la suspensión se repartió entre agua y DCM. La fase orgánica se lavo con solución acuosa de NaHCO₃, se secó sobre MgSO₄, se separó por filtración y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de heptano/AcOEt de 100 a 90/10 para dar 28,2 g (87%) de trifluorometanosulfonato de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-2-ilo (**A1**) como un aceite naranja.

20 LC/MS (m/z, MH⁺): 309

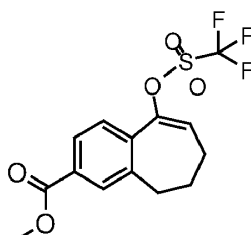
Producto intermedio (B1). 5-Oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-2-carboxilato de metilo



25 Se añadieron Pd(dppf)Cl₂ (754 mg, 0,98 mmol) y diisopropiletilamina (6 ml) a una solución de trifluorometanosulfonato de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-2-ilo (**A1**) (5,03 g, 16,32 mmol) en DMF (24 ml) y MeOH (12 ml). La suspensión negra se carboniló en una autoclave a 70°C bajo 5 bares de CO durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se filtró, a continuación el filtrado se concentró parcialmente bajo presión reducida y el residuo se repartió entre AcOEt y agua. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 75 ml) y HCl acuoso 0,5 N, se secó sobre MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de heptano/AcOEt de 100/0 a 90/10 para dar 3,4 g (95%) de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-2-carboxilato de metilo (**B1**) como un aceite incoloro.

30 LC/MS (m/z, MH⁺): 219

Producto intermedio (C1). 9-(Trifluorometanosulfoniloxi)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo

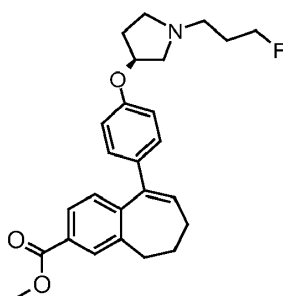


35

Se añadió gota a gota anhídrido trifluorometanosulfónico (30 ml, 176,54 mmol) a una solución de 5-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-5H-benzo[7]anuleno-2-carboxilato de metilo (**B1**) (18,19 g, 83,34 mmol) en DCM (500 ml) y piridina anhidra (11 ml, 130,56 mmol), enfriada a 5°C bajo argón. La mezcla de reacción, una suspensión espesa, se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, a continuación se añadió hielo y se repartió entre agua y DCM. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se separó por filtración y se concentró bajo presión reducida para dar 29 g (100%) de 9-(trifluorometanosulfonilo)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**C1**) como una goma amarilla.

LC/MS (m/z, MH⁺): 351

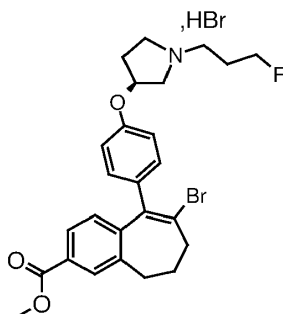
10 **Producto intermedio (G). 9-(4-1[(3S)-1-(3-Fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo**



Se añadieron Pd(dppf)Cl₂ bajo argón, complejo con DCM (3,73 g, 4,57 mmol), y solución acuosa de Cs₂CO₃ 1,5 M (111,12 ml, 166,68 mmol) a una solución de 9-(trifluorometanosulfonilo)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**C1**) (29 g, 82,9 mmol), (3S)-1-(3-fluoropropil)-3-[4-(tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenoxi]pirrolidina (e) (28,9 g, 82,9 mmol), en dioxano (225 ml). La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 1 hora.

Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió en una mezcla de agua (500 ml) y AcOEt (400 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró sobre Celite y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH de 100/0 a 95/05 para dar 23 g (65%) de 9-(4-1[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**G**) como una goma parda.
LC/MS (m/z, MH⁺): 424

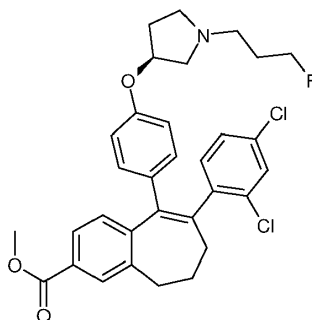
25 **Producto intermedio (H). Hidrobromuro de 8-bromo-9-(4-1[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo**



Se añadió bajo argón tribromuro de piridinio (15,78 g, 44,41 mmol) a una solución de 9-(4-1[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**G**) (13,93 g, 32,89 mmol), en DCM (150 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió agua (200 ml), a continuación la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido eluyendo con un gradiente de DCM/MeOH de 100/0 a 95/05 para dar 16,4 g (85%) de hidrobromuro de 8-bromo-9-(4-1[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**H**) como un merengue amarillo.

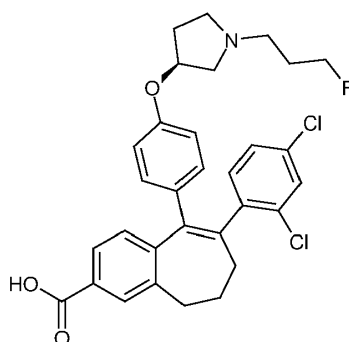
LC/MS (m/z, MH⁺): 502

Producto intermedio (I). Éster metílico de ácido 6-(2,4-dicloro-fenil)-5-[4-[1-(3-fluoro-propil)-pirrolidin-3-iloxi]-fenil]-8,9-dihidro-7H-benzociclohepteno-2-carboxílico.



5 Se añadieron ácido 2,4-diclorofenilborónico (62,67 mg, 328,41 μmol), Cs_2CO_3 (204,48 mg, 626,97 μmol) y $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (14,63 mg, 17,91 μmol) a una solución de hidrobromuro de 8-bromo-9-(4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxi}fenil)-6,7-dihidro-5H-benzo[7]anuleno-3-carboxilato de metilo (**H**) (150 mg, 298,56 μmol), en dioxano (12 ml) y agua (2 ml). La mezcla de reacción se calentó a 90°C durante 3 horas y se repartió entre AcOEt y agua. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna eluyendo con una mezcla de DCM, acetonitrilo y MeOH (96/2/2; V/V/V) para dar 80 mg (47%) de éster metílico de ácido 6-(2,4-dicloro-fenil)-5-[4-[1-(3-fluoro-propil)-pirrolidin-3-iloxi]-fenil]-8,9-dihidro-7H-benzociclohepteno-2-carboxílico (**I**).
10 LC/MS (m/z, MH^+): 568

Compuesto (1). Ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico



15 Se añadió una solución de NaOH (562,88 μl , 5 M) a una solución de éster metílico de ácido 6-(2,4-dicloro-fenil)-5-[4-[1-(3-fluoro-propil)-pirrolidin-3-iloxi]-fenil]-8,9-dihidro-7H-benzociclohepteno-2-carboxílico (**I**) (80 mg, 140,72 μmol) en MeOH (5 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 5 horas y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El residuo se recogió en agua (10 ml) y se añadió HCl acuoso (5 M) hasta pH 7. La suspensión se extrajo con DCM, se secó sobre MgSO_4 y se concentró bajo presión reducida. El sólido se purificó mediante cromatografía en columna eluyendo con una mezcla de DCM, acetonitrilo y MeOH (90/5/5; V/V/V) para dar 60 mg (77%) de ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico.
20

25 ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 1,68 (m, 1 H); 1,79 (dm, $J=25,3$ Hz, 2 H); 2,07 al 2,23 (m, 5 H); 2,38 (m, 1 H); 2,46 (t, $J=7,2$ Hz, 2 H); 2,52 (m, 1 H); 2,62 (m, 1 H); 2,55 al 2,89 (m, 3 H); 4,47 (td, $J=6,2$ y 47,6 Hz, 2 H); 4,72 (m, 1 H); 6,63 (d, $J=8,9$ Hz, 2 H); 6,71 (m, 3 H); 7,18 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H); 8,26 (dd, $J=2,0$ y 8,4 Hz, 1 H); 7,58 (d, $J=2,0$ Hz, 1 H); 7,63 (d, $J=8,4$ Hz, 1 H); 7,79 (s, 1 H); 12,3 (m, 1 H)
LC/MS (m/z, MH^+): 554

30 **2 - Evaluación de la eficacia de ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico combinado con palbociclib contra un xenoinjerto subcutáneo de línea celular de cáncer de mama en ratones atímicos hembra**

35 En el presente estudio, se investigó la eficacia antitumoral del ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico ("compuesto (1)"), combinado con el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) palbociclib, después de 30 días de tratamiento contra un xenoinjerto subcutáneo de línea celular de cáncer de mama humano MCF7-Y537S en ratones atímicos hembra.

Los grupos tratados incluían el compuesto (1) en 5 mg/kg solo, palbociclib en 100 mg/kg solo y la combinación de compuesto (1) y palbociclib en una dosis y un régimen iguales.

- 5 El compuesto (1) se dosificó oralmente dos veces al día (BID) y el palbociclib se dosificó oralmente una vez al día (QD) durante 30 días. La eficacia antitumoral se evaluó mediante la medida del volumen del tumor.

2-1: Procedimiento experimental

2-1-1: Animales, línea celular, compuestos

10 Se obtuvieron ratones atímicos hembra de Harlan (Indianapolis, IN, EE. UU. de A.). Se dejó que los animales se aclimataran durante al menos cuatro días antes de la incorporación en el estudio. Los ratones tenían de 12 a 13 semanas de edad y pesaban entre 20,2 y 27,3 gramos al principio de los tratamientos. Estos animales se alojaron bajo las condiciones esbozadas en the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals de acuerdo con the USDA Laboratory Animal Welfare Act.

15 Se obtuvieron células MCF7 parentales de the American Type Culture Collection (ATCC® HTB-22™). La línea celular MCF7-Y537S (ESR1) era células MCF7 que expresaban la variante ER.Y537S que era generada por Sanofi Biology Discovery Group. La mutación Y537S se introducía en la construcción ESR1 (GenBank NM_000125.3) mediante mutagénesis dirigida (Toy W. y cols., Cancer Discovery, 2017, 7, 277-287). La construcción se transfeció en células MCF7 que se seleccionaban con respecto a su crecimiento en ausencia de estradiol. MCF-Y537S es una
20 mutación de ESR1 que confiere actividad independiente de estrógenos a ER α (receptor estrogénico alfa) y contribuye a una enfermedad endocrinoresistente (Robinson D.R. y cols., Nat Genet., 2013, 45 (12), 1446-1451). Las células se hicieron crecer en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), insulina humana, en CO₂ al 5% a 37°C. Las células se recogieron en tripsina-EDTA al 0,25% y se lavaron mediante solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se resuspendieron en DPBS con
25 matrigel (nº de catálogo de Becton Dickinson 356234, lote nº 32277) al 50%. Las células (20 × 10⁶ células/por ratón) se implantaron subcutáneamente (SC) en el costado derecho de ratones atímicos hembra.

30 Cuando se establecían los tumores MCF7-Y537S, los tumores se reservaron como provisiones de tumor para la implantación de fragmentos. Los tumores se propagaron en serie a través de trasplante de tejidos fragmentarios subcutáneamente. Los tejidos tumorales fragmentarios se implantaron subcutáneamente en el costado derecho de ratones atímicos hembra. Se asignaron 50 ratones en este experimento.

El compuesto (1) y palbociclib (disponible comercialmente, vendido bajo el nombre comercial Ibrance®) se formularon como sigue:

- 35 · Vehículo A: Labrasol® (suministrado de Gattefosse SAS, Francia) al 20%;
· Vehículo B: Dextrosa al 5%.

El compuesto (1) se preparó en el Vehículo A, a continuación se añadió Solutol HS15 (adquirido de Sigma) hasta la concentración final 5% y la solución se dejó bajo agitación durante una hora para la disolución completa. Después de eso, se añadió el vehículo B. El pH final era 5,5.

40 Volumen de la dosis para la administración de compuesto (1): 10 ml/kg mediante sonda oral.

Dosis: 5 mg/kg (dosificación de compuesto (1) en el volumen anterior).

45 Se preparó palbociclib en Vehículo A, a continuación se añadió Solutol HS15 hasta la concentración final 5% y la solución se dejó bajo agitación durante una hora para la disolución completa. Después de eso, se añadió vehículo B. El pH final era 5,5.

50 Volumen de la dosis: 10 ml/kg mediante sonda oral.

Dosis: 100 mg/kg (dosificación de palbociclib en el volumen anterior).

2-1-2: Diseño del estudio, criterios de valoración

55 Los animales requeridos para el experimento (más otros) se reunieron y se les implantaron tejidos fragmentarios de tumor MCF7-Y537S el día 0. El día 21 después de la implantación, los ratones se reunieron y se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de tratamiento y control (10 ratones por grupo), donde los volúmenes tumorales

medianos para cada grupo variaban de 202,5 a 211,5 mm³. Los tratamientos de compuesto (1) y palbociclib se iniciaron el día 22. El compuesto (1) se administró oralmente a 5 mg/kg BID (separadas al menos 5 horas) y el palbociclib se administró oralmente a 100 mg/kg QD, durante 30 días. El peso corporal de los animales se determinó diariamente.

5 Las dosificaciones se expresan en mg/kg y se basan en el peso corporal diario por animal. Se usaron como controles animales tratados con vehículo. Los ratones se comprobaron diariamente y se apuntaron las reacciones clínicas adversas. Los ratones individuales se pesaron diariamente hasta el final del experimento. Los ratones se sacrificarían cuando estuvieron mórbidos o se observara una pérdida de peso $\geq 20\%$. Los tumores se midieron con un calibre dos veces por semana hasta el sacrificio final. Cuando un tamaño del tumor alcanzaba aproximadamente 2000 mm³ o cuando había problemas con la salud de los animales (40% de superficie de un tumor ulcerada), los animales se sacrificarían y se registraría la fecha de la muerte. Los volúmenes de los tumores sólidos se estimaron a partir de medidas bidimensionales del tumor y se calcularon según la siguiente ecuación:

$$15 \quad \text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = \frac{\text{longitud (mm)} \times \text{anchura}^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

Criterios de valoración de toxicidad:

Una dosificación que produjera bien 15% de pérdida de peso corporal durante 3 días consecutivos para un ratón individual, bien 20% de pérdida de peso corporal durante 1 día o bien 10% o más de muertes relacionadas con el fármaco se consideraba una dosificación excesivamente tóxica, a menos que bajo ciertas circunstancias la pérdida de peso corporal o la muerte de los animales se puedan considerar no relacionados con el fármaco. Ejemplos incluyen problemas con el manejo de los animales tales como mala alimentación forzada, problemas relacionados con el modelo del tumor tales como caquexia inducida por el tumor que conduce a pérdida de peso corporal que se puede observar en grupos tratados con control o vehículo y ulceración tumoral excesiva. Los ratones que sufrían muerte o pérdida de peso significativa no relacionadas con el fármaco no se considerarían tóxicos y se excluirían del análisis estadístico. El peso corporal del animal incluía el peso del tumor.

Criterios de valoración de eficacia:

Los criterios de valoración de eficacia primarios incluyen cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia resumidos por la relación de medianas de cambios de volumen del tumor desde el valor de referencia entre los grupos tratado y de control ($\Delta T/\Delta C$). Los cambios en el volumen del tumor para cada grupo tratado (T) y de control (C) se calculan para cada animal cada día al sustraer el volumen del tumor el día del primer tratamiento (día inicial) del volumen del tumor el día de observación especificado. El ΔT mediano se calcula para el grupo tratado y el ΔC mediano se calcula para el grupo de control. La relación $\Delta T/\Delta C$ se calcula y se expresa como porcentaje:

$$\Delta T/\Delta C = \left(\frac{\text{deltaT mediano}}{\text{deltaC mediano}} \right) \times 100$$

35 $\Delta T/\Delta C \leq 40\%$ se considera terapéuticamente activa, $\Delta T/\Delta C = 0\%$ se considera estasis tumoral, y $\Delta T/\Delta C < 0\%$ se considera regresión tumoral (muy activa). $\Delta T/\Delta C > 40\%$ se considera terapéuticamente inactiva.

El porcentaje de regresión tumoral se define como % (porcentaje) de disminución del volumen del tumor en el grupo tratado en un día de observación especificado en comparación con su volumen cuando se iniciaba el estudio. En un momento específico (t) y para cada animal, el porcentaje de regresión se calcula usando la siguiente fórmula:

$$40 \quad \% \text{ regresión (en } t) = \left(\frac{\text{volumen}_{t_0} - \text{volumen}_t}{\text{volumen}_{t_0}} \right) \times 100$$

El porcentaje de regresión mediano para un grupo en un día dado se calcula a continuación al tomar la mediana de los valores de % de regresión individuales calculados para cada animal del grupo. El día del cálculo está determinado por el día en el que se calcula $\Delta T/\Delta C$, excepto si el porcentaje de regresión mediano no es representativo de la actividad del grupo. En este caso, el día está determinado por el primer día en el que el porcentaje de regresión mediando es máximo.

2-1-3: Análisis estadístico

50 Un análisis de tipo Anova bidireccional con los factores tratamiento y día (repetidos) se realiza sobre los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia. Esto está seguido por análisis de contraste con corrección de Bonferroni-Holm para la multiplicidad para comparar todos los grupos tratados con el grupo de control y para

comparar la combinación frente a cada agente individual a la dosis implicada en la combinación cada día del día 27 al 51.

5 En las figuras, las medianas y la desviación absoluta mediana (MAD) de cada grupo se representan para cada día de medida.

En las tablas, las medianas y la MAD normalizada ($nMAD = 1,4826 * MAD$) de cada grupo se presentan para cada día de medida.

10 Los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia se calculan para cada animal y cada día al sustraer el volumen del tumor el día del primer tratamiento (día 21) del volumen del tumor el día de observación especificado

15 Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa SAS versión 9.2. Una probabilidad de menos de 5% ($p < 0,05$) se consideraba significativa.

2-2: Resultados

20 El compuesto (1) en 5 mg/kg BID, palbociclib 100 mg/kg QD y la combinación de compuesto (1) y palbociclib a las dosis y el régimen durante 30 días eran bien tolerados en este estudio que muestra un cambio en el peso corporal promedio en % por grupo en el mínimo (la más baja de la caída de peso corporal del grupo) de -1,7% (día 22), -2,0% (día 22) y -6,4% (día 26), respectivamente (Tabla 1).

25 El compuesto (1) en una dosis de 5 mg/kg BID durante 30 días tenía un efecto mínimo sobre el crecimiento tumoral con un valor $\Delta T/\Delta C$ de 59% ($p = 0,4113$) el día 51. El palbociclib en una dosis de 100 mg/kg QD durante 30 días alcanzaba eficacia antitumoral con un valor de $\Delta T/\Delta C$ de 27% ($p < 0,0001$) el día 51. Cuando el compuesto (1) en 5 mg/kg combinado con 100 mg/kg de palbociclib con el mismo régimen de dosificación BID para el compuesto (1) y QD para el palbociclib, el tratamiento combinado demostraba una fuerte eficacia antitumoral con un valor de $\Delta T/\Delta C$ menor de 0 ($p < 0,0001$) e inducía la regresión tumoral (regresión tumoral mediana 32%) el día 51. El análisis estadístico indicaba que el efecto combinado era significativamente diferente cuando se comparaba bien con el compuesto (1) solo o bien con palbociclib solo el día 51 ($p < 0,0001$). Resultados detallados se muestran en las Tablas 1, 2 y 3 posteriores, así como en las Figuras 2 y 3:

- Figura 2: Actividad antitumoral del compuesto (1) combinado con palbociclib contra xenoinjerto subcutáneo de la línea celular MCF7-Y537S de cáncer de mama humano en ratones atímicos: evolución del volumen del tumor. Las curvas representan medianas + o - MAD (desviación absoluta mediana) cada día para cada grupo;

35 - Figura 3: Actividad antitumoral del compuesto (1) combinado con palbociclib contra xenoinjerto subcutáneo de la línea celular MCF7-Y537S de cáncer de mama humano en ratones atímicos: cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia el día 51. Los puntos representan cambios en el volumen del tumor individuales desde el valor de referencia el día 51, las barras corresponden a las medianas.

40 A partir de este experimento, los presentes inventores concluyen que el compuesto (1) en 5 mg/kg dos veces al día combinado con el inhibidor de CDK4 palbociclib en 100 mg/kg una vez al día inducían una eficacia antitumoral y una regresión tumoral significativas en el modelo de xenoinjerto de la línea celular de cáncer de mama humano MCF7-Y537S en ratones atímicos que era superior a los agentes individuales solos.

Tabla 1: Eficacia del compuesto (1) combinado con palbociclib contra xenoinjerto subcutáneo de cáncer de mama humano MCF7-Y537S en ratones atímicos.

Agente	Via / Dosificación (en ml/kg por inyección)	Dosificación en mg/kg por inyección (dosis total)	Plan en días (total de 30 días)	*Muerte no planificada (Día de la muerte)	Cambio promedio de peso corporal en % por grupo en el mínimo (día del mínimo)	ΔT/AC en % el día 51	% mediano de regresiones el día 51	Regresiones		Valor de p el día 47#	Interpretación Biológica
								Parciales	Completas		
Vehículo	PO, BID (10)	-	-	0/10	-2,2 (22)	100	-	0/10	0/10	-	-
Compuesto (1)	PO, BID (10)	5 (295) N.B.	de 22 a 51	2/10	-1,7(22)	59	NR	0/8	0/8	p = 0,4113	Inactiva
Palbociclib	PO, QD (10)	100 (3000)	de 22 a 51	0/10	-2,0 (22)	27	NR	0/10	0/10	p < 0,0001	Activa
Compuesto (1) + Palbociclib	PO, BID (10) PO, QD (10)	5 (295) N.B. + 100 (3000)	de 22 a 51	1/10	-2,3 (26)	<0	32	2/9	0/9	p < 0,0001	Muy activa

PO: por vía oral
N.B.: los animales aceptaban una dosis en la fecha inicial.
NR: sin regresión (0% de regresión).
Análisis estadístico: Comparación de cada agente individual y combinación frente al grupo de control. Los valores de p se obtuvieron usando un análisis de contraste para comparar cada grupo tratado frente al control cada día usando el ajuste de Bonferroni-Holm para multiplicidad después de un análisis tipo Anova bidireccional con medidas repetidas sobre los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia. Una probabilidad menor de 5% (p<0.05) se consideraba significativa.
*3 ratones fueron excluidos del análisis estadístico debido a que esos ratones correspondían a muerte o interrupciones no relacionadas con el fármaco durante el estudio.

Tabla 2: Eficacia del compuesto (1) combinado con palbociclib contra el modelo de xenoinjerto subcutáneo de la línea celular de cáncer de mama humano MCF7-Y637S en ratones atímicos. Comparación de cada grupo con el grupo de control cada día.

		Cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia mm ³ : Mediana (nMAD)*, n y valor de p [#]												
Grupo de Tratamiento	Global	Día 27	Día 30	Día 34	Día 37	Día 41	Día 44	Día 49	Día 51					
Control	-	111,5 (44,48) n=10	181,0 (78,58) n=10	296,0 (133,43) n=10	392,0 (235,73) n=10	663,0 (363,24) n=10	867,0 (456,64) n=10	1140,0 (615,28) n=10	1322,0 (633,07) n=10					
	-	114,0 (19,27) n=8	171,5 (31,13) n=8	270,5 (112,68) n=8	336,0 (112,68) n=8	440,0 (39,29) n=8	498,5 (91,18) n=8	727,5 (160,86) n=8	782,0 (112,68) n=8					
Compuesto (1) 5 mg/kg	0,3975	0,6333 n=8	0,3909 n=8	0,7343 n=8	0,5990 n=8	0,2495 n=8	0,1950 n=8	0,3770 n=8	0,4113 n=8					
	-	68,5 (31,88) n=10	98,0 (25,20) n=10	121,5 (34,10) n=10	132,0 (31,88) n=10	193,5 (52,63) n=10	249,5 (43,74) n=10	298,5 (97,11) n=10	363,5 (108,23) n=10					
Palbociclib 100 mg/kg	<0,0001	0,1164 n=9	0,0009 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9					
	-	-8,0 (63,75) n=9	-17,0 (97,85) n=9	-35,0 (74,13) n=9	-30,0 (57,82) n=9	-43,0 (60,79) n=9	-63,0 (45,96) n=9	-53,0 (72,65) n=9	-52,0 (72,65) n=9					
Compuesto (1) 5 mg/kg + Palbociclib 100 mg/kg	<0,0001	0,0077 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9	<0,0001 n=9					

valores de p obtenidos con un análisis de contraste frente al control cada día con ajuste de Bonferroni-Holm para la multiplicidad después de un análisis tipo Anova bidireccional sobre los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia.

* MAD= Desviación absoluta mediana; nMAD= MAD normalizada; nMAD= 1,4826*MAD.

Para palbociclib en 100 mg/kg, el efecto sobre los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia es significativo en comparación con el grupo de control del día 30 al día 51.

Para la combinación compuesto (1) en 5 mg/kg + palbociclib en 100 mg/kg, el efecto sobre los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia es significativo en comparación con el grupo de control del día 27 al día 51.

n = número de animales. 3 ratones fueron excluidos del análisis estadístico debido a que esos ratones correspondían a muerte o interrupciones no relacionadas con el fármaco durante el estudio.

Tabla 3: Eficacia del compuesto (1) combinado con palbociclib contra el modelo de xenoinjerto subcutáneo de la línea celular de cáncer de mama humano MCF7-Y537S en ratones atímicos. Comparación de compuesto (1) 5 mg/kg y palbociclib 100 mg/kg como agentes individuales frente a la combinación cada día.

Cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia mm ³ : Mediana (nMAD)*, n y valor de p [#]												
Grupo de Tratamiento	Global	Día 27	Día 30	Día 34	Día 37	Día 41	Día 44	Día 49	Día 51			
Compuesto (1) 5 mg/kg + Palbociclib 100 mg/kg	-	-8,0 (63,75) n=9	-17,0 (97,85) n=9	-35,0 (74,13) n=9	-30,0 (57,82) n=9	-43,0 (60,79) n=9	-63,0 (45,96) n=9	-53,0 (72,65) n=9	-52,0 (72,65) n=9			
	-	68,5 (31,88) n=10	98,0 (25,20) n=10	121,5 (34,10) n=10	132,0 (31,88) n=10	193,5 (52,63) n=10	249,5 (43,74) n=10	298,5 (97,11) n=10	363,5 (108,23) n=10			
Palbociclib 100 mg/kg	<0.0001	0,2417 n=10	0,0736 n=10	0,0026 n=10	0,0002 n=10	<0.0001 n=10	<0.0001 n=10	<0.0001 n=10	<0.0001 n=10			
	-	114,0 (19,27) n=8	171,5 (31,13) n=8	270,5 (112,68) n=8	336,0 (112,68) n=8	440,0 (39,29) n=8	498,5 (91,18) n=8	727,5 (160,86) n=8	782,0 (112,68) n=8			
Compuesto (1) 5 mg/kg	<0.0001	0,0342 n=8	<0.0001 n=8	<0.0001 n=8	<0.0001 n=8	<0.0001 n=8	<0.0001 n=8	<0.0001 n=8	<0.0001 n=8			
	-	114,0 (19,27) n=8	171,5 (31,13) n=8	270,5 (112,68) n=8	336,0 (112,68) n=8	440,0 (39,29) n=8	498,5 (91,18) n=8	727,5 (160,86) n=8	782,0 (112,68) n=8			

valores de p obtenidos con un análisis de contraste para comparar las combinaciones de compuesto (1) y palbociclib frente a cada agente individual a la dosis implicada en la combinación cada día con ajuste de Bonferroni-Holm para la multiplicidad después de un tipo Anova bidireccional sobre los cambios en el volumen del tumor desde el valor de referencia.

* MAD= Desviación absoluta mediana; nMAD= MAD normalizada; nMAD= 1,4826*MAD.

El efecto de la combinación de compuesto (1) en 5 mg/kg + palbociclib en 100 mg/kg es significativamente mayor que el efecto de palbociclib en 100 mg/kg solo del día 34 al día 51.

El efecto de la combinación de compuesto (1) en 5 mg/kg + palbociclib en 100 mg/kg es significativamente mayor que el efecto del compuesto (1) en 5 mg/kg solo del día 27 al día 51.

n = número de animales. 3 ratones fueron excluidos del análisis estadístico debido a que esos ratones correspondían a muerte o interrupciones no relacionadas con el fármaco durante el estudio.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib.
- 5 2. La combinación según la reivindicación 1, que muestra sinergia terapéutica.
3. La combinación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento del cáncer.
- 10 4. La combinación según la reivindicación 3, en donde el cáncer es cáncer de mama.
5. La combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde ambos compuestos se administran separadamente, simultáneamente o espaciadamente a lo largo del tiempo.
- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y palbociclib, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. La composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde el ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y el palbociclib se administran simultáneamente, separadamente o espaciadamente a lo largo de un período.
- 25 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para el uso en el tratamiento del cáncer.
9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer de mama.
- 30 10. El compuesto ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para el uso en el tratamiento del cáncer mediante la coadministración con palbociclib.
- 35 11. El compuesto para el uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, que se administra simultáneamente, separadamente o espaciadamente a lo largo del tiempo con palbociclib.
- 40 12. Palbociclib para el uso en el tratamiento del cáncer mediante la coadministración con el compuesto ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
13. Palbociclib para el uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 12, que se administra simultáneamente, separadamente o espaciadamente a lo largo del tiempo con el compuesto ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 45 14. Un estuche farmacéutico que comprende:
 - (i) una primera composición farmacéutica que comprende ácido 6-(2,4-diclorofenil)-5-[4-[(3S)-1-(3-fluoropropil)pirrolidin-3-il]oxifenil]-8,9-dihidro-7H-benzo[7]anuleno-2-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;
 - (ii) una segunda composición farmacéutica que comprende palbociclib y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- 50 estando ambas composiciones farmacéuticas (i) y (ii) en compartimentos separados y estando destinadas a ser administradas independientemente, siendo cada administración con respecto a la otra simultánea, separada o extendida a lo largo del tiempo.

Figura 1/3

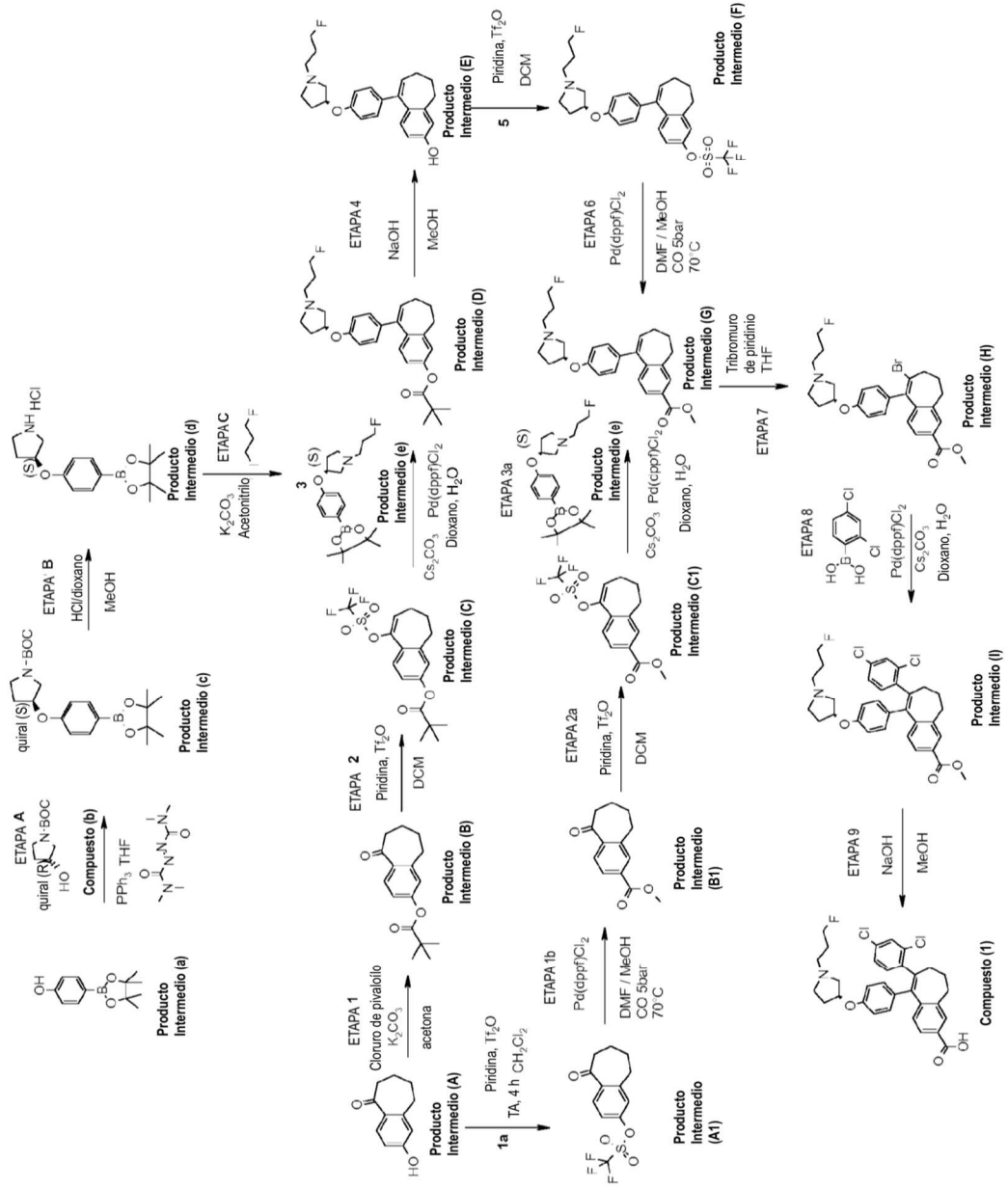


Figura 2/3

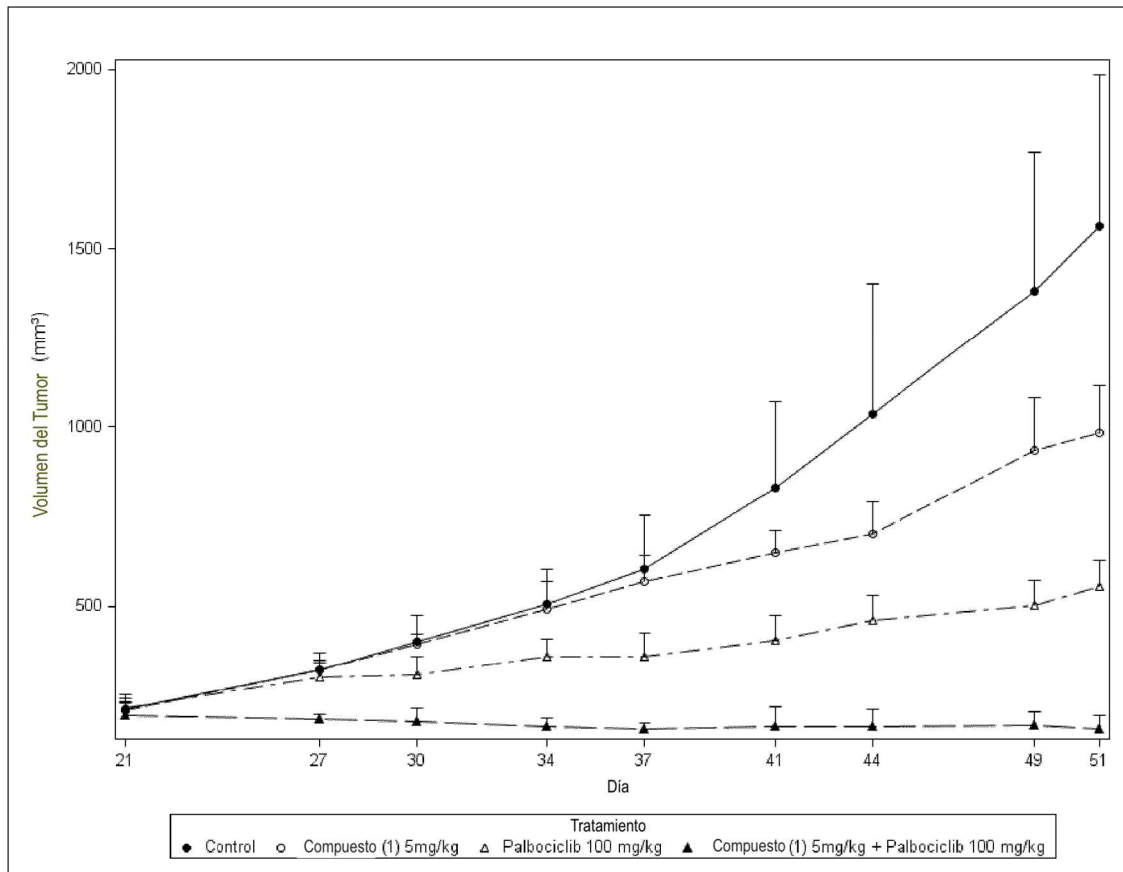


Figura 3/3

