

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 017**

51 Int. Cl.:

A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4166 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 33/24 (2009.01)
A61K 33/243 (2009.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2020 PCT/EP2020/069459**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2021 WO21005183**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2020 E 20739952 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3996710**

54 Título: **Inhibidor de serina/treonina quinasa 1 de interacción con MAP quinasa (MNK1) y de serina/treonina quinasa 2 de interacción con MAP quinasa (MNK2), métodos de terapia del cáncer y combinaciones terapéuticas**

30 Prioridad:

10.07.2019 ES 201930643

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

16.04.2025

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (33.33%)
 Pg. Vall d' Hebron, 119-129
 08035 Barcelona, ES;
 INSTITUT QUÍMIC DE SARRIÀ CETS FUNDACIÓ PRIVADA (33.33%) y
 CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (33.33%)**

72 Inventor/es:

**RAMON Y CAJAL AGÜERAS, SANTIAGO;
 HÜMMER, STEFAN;
 CASTELLVI VIVES, JOSEP;
 MARTINEZ SÁEZ, ELENA;
 BORRELL BILBAO, JOSÉ IGNACIO;
 TEIXIDÓ CLOSA, JORDI;
 ESTRADA TEJEDOR, ROGER;
 BOU PETIT, ELISABETH;
 PEG CAMARA, VICENTE;
 GUIJARRO CARRILLO, PEDRO JESUS;
 SANTAMARIA MARGALEF, ANNA;
 MOROTE ROBLES, JOAN y
 SUAREZ CABRERA, LETICIA**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 3 014 017 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

Inhibidor de serina/treonina quinasa 1 de interacción con MAP quinasa (MNK1) y de serina/treonina quinasa 2 de interacción con MAP quinasa (MNK2), métodos de terapia del cáncer y combinaciones terapéuticas

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Española P201930643 presentada el 10 de julio de 2019.

Campo técnico

10

La presente invención se refiere a la 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como un inhibidor de MNK selectivo, para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente, en particular para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario o cáncer de endometrio.

15

Antecedentes de la técnica

El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres de todo el mundo y la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer. A pesar de los avances globales en el tratamiento del cáncer, la letalidad en algunos subtipos de cáncer de mal pronóstico no ha mejorado sustancialmente en los últimos años. Entre los diferentes subtipos de cáncer de mama de mal pronóstico se encuentra el cáncer de mama triple negativo (CMTN), caracterizado por la ausencia de receptor de estrógeno α (ER, *estrogen receptor*), receptor de progesterona (PR, *progesterone receptor*) y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2) [Clin Cancer Res. 2007;13:4429-4434]. Este subtipo de cáncer se desarrolla comúnmente con un fenotipo histopatológico relativamente agresivo y tiende a diagnosticarse a edades más tempranas que en los casos con ER-positivo [Nat Rev Clin Oncol. 2016;13:674-690; Oncologist. 2011;16 Suppl 1:1-11; Breast Cancer Res. 2010;12:212]. Dado que los tumores triple negativos carecen de las dianas principales de las terapias aprobadas, su cura se limita actualmente a la aplicación de cirugía, radioterapia y/o quimioterapia sistémica. Por lo tanto, a pesar de los avances en la comprensión de la biología subyacente de subtipos específicos de cáncer, es de vital importancia identificar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades.

Muchos estudios han demostrado un beneficio clínico significativo de la quimioterapia en CMTN en los entornos neoadyuvante, adyuvante y metastásico. Paradójicamente, los casos de CMTN generalmente muestran mejores respuestas iniciales a la quimioterapia que los pacientes con otros subtipos de cáncer de mama [J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2008;26:1275-1281]. Sin embargo, sólo se consiguen respuestas patológicas completas en el 30-40 % de los casos en una fase temprana, y los pacientes que no muestran este nivel de respuesta tienen un riesgo de muerte 12 veces mayor [Lancet Lond. Engl. 2014;384:164-172; J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2012;30:1796-1804]. Para mejorar la cura del cáncer en este contexto, se están probando nuevas estrategias, como la inmunoterapia, pero hasta ahora su éxito es limitado [Med. Oncol. Northwood Lond. Engl. 2017;35:13].

40

Otros subtipos que son positivos a estrógenos tienen un mejor pronóstico pero un alto riesgo de recurrencias tardías. De hecho, los pacientes se tratan con antiestrógenos durante muchos años. (J Clin Oncol. 10 de marzo de 2015; 33(8):916-22). En este sentido, se están probando varios enfoques combinatorios para optimizar, incluida la combinación con inhibidores de mnk (Genes Dev. 15 de noviembre de 2017; 31(22):2235-2249)

45

Otro tipo de cáncer que con el tiempo desarrolla insensibilización a los tratamientos aprobados es el cáncer de próstata. El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer entre los hombres de los países occidentales [CA Cancer J Clin. enero de 2020; 70(1):7-30]. La mayoría de las muertes se producen tras el fracaso de la terapia de privación de andrógenos, cuando el tumor evoluciona a cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). A pesar de la respuesta inicial a las terapias antihormonales de segunda línea (tales como abiraterona y enzalutamida), los pacientes suelen desarrollar resistencia a estos agentes [BJU Int. Febrero de 2016; 117(2):215-25]. La producción, amplificación o expresión intratumoral de andrógenos de variantes de corte y empalme constitutivamente activas del AR que carecen del dominio de unión a ligando carboxiterminal (siendo AR-V7 uno de los más comúnmente encontrados en pacientes con CPRC) son algunos de los mecanismos clínicos más importantes de resistencia a las terapias antihormonales [Cancer Treat Rev. Junio de 2017; 57:16-27]. Dado que uno de los principales obstáculos para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado es la resistencia a los fármacos, se desean estrategias terapéuticas combinatorias. La desregulación de la síntesis de proteínas es un acontecimiento común en el cáncer humano y, en particular, en la resistencia a los agentes quimioterápicos. Un factor clave en el control de la traducción es el factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E), cuya función modula la proteína serina/treonina quinasa 1 de interacción con MAP quinasa, MNK1, y la proteína serina/treonina quinasa 2 de interacción con MAP quinasa, MNK2, a través de la fosforilación de una serina conservada (Ser209).

En los últimos años, eIF4E se ha descrito como un factor pronóstico independiente asociado a un avance maligno y a un pronóstico adverso en diferentes tumores, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, glioma y cáncer de próstata [Clin Transl Oncol. 2014;16:937-1113]. Otros grupos han confirmado la

65

importancia pronóstica de estos factores en tipos de tumores adicionales, como cáncer de colon [Oncotarget. 2015; 6:24092-24104], carcinoma nasofaríngeo [PLoS ONE. 2014;9:e89220], carcinoma hepatocelular [J Cancer Res Clin Oncol. 2016; 142:2309-2317], astrocitomas [J Neurooncol. 2016; 131:485-493], cáncer de pulmón [Virchows Arch. 2015;467:667-673; Int J Clin Exp Pathol. 2015;8:3955-3962] y melanoma [J Invest Dermatol. 2015;135:1358-1367]. El peor pronóstico se ha asociado a un aumento de la transición epitelio-mesénquima en células con sobreexpresión de p-eIF4E [Oncogene. 2015;34(16):2032-2042] y a una mayor resistencia al estrés celular oxidativo, falta de nutrientes y a agentes antitumorales [PLoS ONE. 2015;10(4):e0123352].

Los estudios han aportado una prueba de concepto de que la desregulación del inicio de la traducción mediada por eIF4E es un paso importante en la transformación oncogénica y puede contribuir al mantenimiento del tumor. Aunque la fosforilación es necesaria para la transformación oncogénica, parece ser prescindible para el desarrollo normal. Por lo tanto, los inhibidores farmacológicos de MNK pueden presentar una estrategia no tóxica y eficaz contra el cáncer, especialmente junto con tratamientos aprobados. Resumiendo, las MNK1/2 han surgido como dianas de interés para el descubrimiento de fármacos en oncología, basándose en los efectos antitumorales observados en los experimentos usando interferencia por el ARN y en la ausencia de efectos adversos en animales con doble inactivación (*knockout*) [Mol Cell Biol. 2004;24(15):6539-6549]. Sin embargo, la falta de inhibidores selectivos de MNK ha dificultado la validación de dianas farmacológicas y el desarrollo clínico.

Aunque las funciones de las MNK en el desarrollo y avance de los tumores están bien establecidas, aún están en desarrollo inhibidores específicos de MNK mono o duales con niveles satisfactorios de selectividad. Inhibidores como Cercosporamida [Cancer Biol Ther. 2015;16(5):648-656] o CGP57380 [Cancer Res. 2011; 71:1849-1857], utilizados durante muchos años para el estudio de estas quinasas, destacan por su baja selectividad [Biochem. J. 2007;408(3):297-315; Curr Med Chem. 2017;24(28):3025-3053].

Las MNK pertenecen a la familia de las proteínas serina/treonina quinasas y se clasifican como miembros de las quinasas dependientes de Ca²⁺/calmodulina.

Las quinasas MNK están presentes en dos isoformas: MNK1 y MNK2. MNK1 es una isoforma inducible, fácilmente fosforilable por ERK y p-38, mientras que MNK2 tiene una elevada actividad basal.

Si bien su arquitectura estructural general se asemeja a la de otras proteínas quinasas, las MNK contienen varios elementos inusuales [Oncotarget. 2012;3:118-131; Chem Biol. 2014;4:441-452]. Estas diferencias abren la posibilidad de desarrollar inhibidores altamente selectivos. Los estudios estructurales realizados en los últimos años han propuesto diferentes tipos de interacciones entre los ligandos y los sitios activos de las quinasas: Tipo I (conformación activa de la quinasa), Tipo II (conformación inactiva de la quinasa), Tipo III (inhibidores alostéricos) y tipo VI (inhibidores irreversibles) [Curr Med Chem. 2017;24(28):3025-3053].

Recientemente, los dos primeros inhibidores de MNK desarrollados por Effector Therapeutics y Bayer AG (eFT508 y BAY 1143269, respectivamente) han entrado en ensayos clínicos en oncología [J Med Chem. 2018;61(8):3516-3540; Cancer Lett. 2017;390:21-29]. De acuerdo con la clasificación de los inhibidores de MNK, ambos son inhibidores de tipo I y actúan de una manera competitiva por el ATP. eFT508 se ha aplicado con éxito en el tratamiento combinado con un inhibidor de mTOR (everolimus) en linfomas de células B grandes, y BAY1143269 se ha combinado con taxanos en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico. Si bien estos resultados confirman que MNK1/2 son una diana valiosa para impedir la adaptación a los tratamientos aprobados, el modo de acción competitivo de ATP puede obstaculizar un uso más amplio de estos inhibidores en otros tipos de cáncer. A este respecto, no se han publicado resultados con respecto al tratamiento del CMTN con ambos inhibidores de Tipo I.

En los últimos años, diversos grupos de investigación han participado en el desarrollo de inhibidores de MNK1/2 utilizando diversos sistemas heterocíclicos como estructura de base. En particular, son relevantes para esta solicitud de patente los trabajos que han utilizado los sistemas heterocíclicos 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina como estructura de base para desarrollar inhibidores de quinasas. Por tanto, en el documento US 2010/0113415 se describe el uso de dichos heterociclos como inhibidores de la tirosina quinasa del receptor EphA4, que son útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos y neurodegenerativos, cáncer y otras afecciones reguladas por la señalización de la tirosina quinasa del receptor EphA4. Los dos compuestos probados en el documento US 2010/0113415, etiquetados como Ejemplos 63 y 67, proporcionaron un efecto demostrado como inhibidores de la tirosina quinasa del receptor EphA4. Estos ensayos no ilustran ni confirman, sin embargo, que son útiles en el tratamiento de cánceres de órganos hormonodependientes, tal como el cáncer de mama (incluido el CMTN), cáncer de ovario, cáncer de endometrio y cáncer de próstata, mucho menos que todos los demás compuestos enumerados implican dicho efecto inhibidor de la tirosina quinasa del receptor EphA4.

En el documento WO 2016/172010 A1 se desvela la combinación de un inhibidor de MNK con un inhibidor, tal como un anticuerpo o ARNi, de PD-1 o PD-L1, y opcionalmente con un agente quimioterápico, tal como docetaxel, para su uso en el tratamiento de diversos cánceres.

En Liu S. *et al.*, "Inhibiting ERK/Mnk/eIF4E broadly sensitizes ovarian cancer response to chemotherapy", Clinical And

Translational Oncology, vol. 20, n.º 3, páginas 374 - 381, se desvela que la activación de ERK/Mnk/eIF4E está críticamente implicada en la quimiorresistencia del cáncer de ovario y que la inhibición de ERK/Mnk/eIF4E sensibiliza ampliamente la respuesta del cáncer de ovario a la quimioterapia.

- 5 En Vidya P. Ramamurthy *et al.*, "Simultaneous targeting of androgen receptor (AR) and MAPK-interacting kinases (MNKs) by novel retinamides inhibits growth of human prostate cancer cell lines", *Oncotarget*, vol. 6, n.º 5, páginas 3195 - 3210 se desvela que la inhibición simultánea de la activación del AR y eIF4E es un enfoque terapéutico novedoso y eficaz para el cáncer de próstata, y que las Retinamidas Novedosas son muy prometedoras para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado.

10

En Choi CH *et al.*, "Direct inhibition of eIF4E reduced cell growth in endometrial adenocarcinoma". *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011, vol. 137, n.º 3, páginas 463-469 se desvela que eIF4E podría ser una diana terapéutica prometedora en el cáncer de endometrio.

- 15 En Hou S, *et al.* "Significance of MNK1 in prognostic prediction and chemotherapy development of epithelial ovarian cancer". *Clin Transl Oncol*. 2017, vol. 19, n.º 9, páginas 1107-1116 se desvela que MNK1 puede actuar como posible diana para el desarrollo de quimioterapia novedosa contra el cáncer epitelial de ovario.

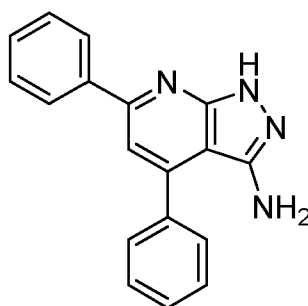
Así mismo, en el documento WO 2011/019780 se reivindica el uso de estos sistemas heterocíclicos como inhibidores de enzimas proteína quinasa para el tratamiento de trastornos alérgicos, enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias, y cánceres. En ninguna de estas patentes, sin embargo, se mencionan las MNK1/2 o la fosforilación de eIF4E.

Por último, en el documento WO 2015/004024 se describen sistemas 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina con un sustituyente heterocíclico muy voluminoso en la posición C5 del sistema pirazolopiridinico. En este caso, los sistemas resultantes están efectivamente reivindicados como inhibidores de la quinasa MNK1 y/o de la quinasa MNK2, mencionando su conexión con eIF4E y su implicación en el tratamiento del cáncer de mama.

Por tanto, aunque se han hecho muchos intentos para proporcionar terapias eficaces contra el cáncer, se siguen necesitando otras alternativas y en particular para los tipos de cáncer que, de alguna manera, se vuelven resistentes o insensibles a las terapias habituales.

Explicación de la invención

- 35 La presente invención resulta del sorprendente efecto inhibitor de MNK1/2 de uno de los derivados más sencillos 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina: compuesto 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, (denominado en esta descripción EB1).



EB1

40

Dicho compuesto se describió por primera vez en el documento DE 2160780 (1973) como intermedio para la síntesis de colorantes y en otros artículos y patentes como intermedio de síntesis (como por ejemplo en el documento US 2010/0113415). Sin embargo, aparentemente aún no se ha descrito su posible actividad biológica en relación con MNK1/2.

45

Los inventores descubrieron sorprendentemente que EB1 podía inhibir selectivamente MNK1/2 (CI_{50} enzimática de 0,7 μ M y CE_{50} *in vitro* de aproximadamente 1,5 μ M en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231)). Esta inhibición fue, además, una inhibición de MNK1/2 competitiva no ATP, una característica genuina en relación con los demás inhibidores de MNK1/2 conocidos y disponibles actualmente en el comercio. Por otra parte, como inhibidor

50

de MNK1/2 no resultó tóxico cuando se probó en células normales.

La selectividad de EB1 se probó en un panel de 320 quinastas que incluía la tirosina quinasa del receptor EphA4.

ES 3 014 017 T3

Aunque EB1 se menciona como intermedio para la síntesis de otros compuestos activos con efecto inhibidor de este receptor en el documento US 2010/0113415, no se pudo deducir ninguna actividad para EB1 a partir de los ensayos desvelados en este documento de la técnica anterior. De hecho, en un ensayo inhibidor de EphA4 realizado con EB1 en este panel de quinasas utilizando el mismo protocolo, sólo se obtuvo una inhibición del 10 % a 1 uM, mientras que la inhibición de MNK1 fue del 48 %, por lo que es evidente la prácticamente nula actividad inhibidora de EB1 frente a EphA4.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a la 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina o a una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

También forma parte de la divulgación (pero no de la invención reivindicada) el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

Los resultados de otros derivados estudiados con diversos sustituyentes incluidos en los anillos fenílicos en las posiciones C4 y C6 del sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, han presentado actividades inferiores a las de EB1. Como se explicará con más detalle en la siguiente descripción, EB1 inhibe la fosforilación de eIF4E con una CE_{50} *in vitro* de ~ 1,5 μ M con una inhibición casi completa a partir de 2,5 μ M y el efecto es rápido y dura al menos 72 h; el efecto inhibidor parece deberse a la inhibición directa de las MNK; y digno de mención, EB1 muestra una excelente selectividad por MNK1/2 en relación con otras quinasas.

Los inventores también han descubierto, sorprendentemente, que cuando EB1 se usa junto con determinados compuestos quimioterápicos y/o inmunoterápicos o agentes de los que se usan habitualmente en el tratamiento de estos cánceres de órganos hormonodependientes, el efecto terapéutico observado se incrementa sinérgicamente en términos de uno o más de la reducción del crecimiento celular y la inducción de la apoptosis.

Por tanto, un segundo aspecto de la invención se refiere a combinaciones que comprenden:

- a) una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1 o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorrubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos;

donde la combinación es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

Se proponen estas combinaciones, incluido EB1, sin desear ligarse a ninguna teoría, porque EB1 como inhibidor de MNK permite sensibilizar las células tumorales a las terapias habituales, a las que determinados sujetos o poblaciones han desarrollado resistencia. La resistencia a una terapia contra el cáncer se desarrolla en parte, como se ha indicado anteriormente, debido a la desregulación de la síntesis de proteínas en respuesta al estrés celular causado por agentes tóxicos, tal como un compuesto para tratar el cáncer como mecanismo de protección celular. Las MNK son necesarias en situaciones de estrés celular (activadas por las vías de respuesta al estrés), que a menudo impiden que las terapias clásicas sean eficaces. Dirigirse a las MNK con EB1 o una sal de la misma sensibiliza las células a los tratamientos habituales (*standard of care*) que fracasan debido a la activación de las vías de respuesta al estrés.

Los compuestos en las combinaciones de la invención pueden formularse en diferentes tipos de composiciones/kits de partes. Por tanto, un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición veterinaria o farmacéutica única que comprende:

- a) una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1 o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorrubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;

donde la composición farmacéutica o veterinaria única es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

60

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un envase o kit de partes que comprende:

- i) una primera composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable la misma, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;
- ii) una segunda composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de

65

uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;

5 iii) instrucciones para el uso en combinación de i) y ii);

donde la primera y segunda composiciones son composiciones distintas;

donde el envase o kit de partes es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

10 Por último, justamente debido a la selectividad por MNK1/2, en el presente documento también se desvela (pero no se reivindica) el uso no terapéutico de 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, como un inhibidor selectivo, no citotóxico de la proteína serina/treonina quinasa 1 de interacción con MAP quinasa (MNK1) y de la proteína serina/treonina quinasa 2 de interacción con MAP quinasa (MNK2). Este uso es de interés como inhibidor de MNK1/2 en una muestra aislada que comprende células de

15 mamífero (es decir, biopsias aisladas de tejido tumoral, líneas celulares establecidas, etc.) con el fin de probar combinaciones terapéuticas, o como reactivo en ensayos bioquímicos en los que se utilizan células de mamífero aisladas para estudiar procesos celulares mecánicos, vías metabólicas o para ensayar sustancias en métodos de detección. La inhibición de MNK1 y MNK2 mediante EB1 provoca la inhibición de la fosforilación de eIF4E.

20 Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a comprender mejor las características de la invención, se adjunta un juego de dibujos como parte integrante de dicha descripción, donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

25

La figura 1 muestra un ejemplo de las curvas de valoración de EB1 en células MDA-MB-231 que no muestran ningún efecto sobre las proteínas anteriores y que demuestran una inhibición selectiva de MNK. Los resultados fueron equivalentes a las 24 h y a las 48 h. Concentración final de dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5 %. Se utiliza CGP57380 (CGP) como control positivo y DMSO como control negativo.

30

La figura 2 muestra la curva de valoración EB1 en células MCF10. Concentración final de DMSO 0,5 %. Se utiliza CGP57380 (CGP) como control positivo y DMSO como control negativo.

35 La figura 3 muestra curvas de proliferación para EB1 en células MDA-MB-231 y MCF10. CGP57380 (CGP) y EFT508 se utilizan como controles positivos y DMSO como control negativo. Abs. Norm. es la absorbancia normalizada y T(h) es el tiempo en horas.

La figura 4 muestra el ciclo celular de MDA-MB-231 tratado con EB1. Se utiliza doxorubicina 100 nM como control positivo y DMSO como control negativo.

40

La figura 5 muestra un quinoma para EB1.

La figura 6 muestra una curva de valoración de EB1 en células A375M, MV4-11 y MDA-MB-468. Concentración final de DMSO 0,5 %. Se utiliza CGP57380 (CGP) como control positivo y DMSO como control negativo.

45

La figura 7 muestra que la combinación de doxorubicina (DOXO) con EB1 aumenta la eficacia del fármaco quimioterápico (B) e invierte el aumento de p-eIF4E causado por el estrés celular relacionado con el tratamiento con doxorubicina (A).

50 La figura 8 muestra que el tratamiento de células IMR90, fibroblastos no transformados, no provoca una detención significativa del crecimiento celular (figura A, donde CCR es crecimiento celular relativo) y no induce la muerte celular (figura B, % de células apoptóticas). En cambio, en todas las líneas celulares de cáncer de mama ensayadas (MDA-MB231, MCF7 y MDA-MB468) el crecimiento celular se inhibe de manera dependiente de la dosis. DMSO significa dimetilsulfóxido; CDDP es cisplatino; CCR es crecimiento celular relativo

55

La figura 9 muestra que el tratamiento de células MCF7 con EB1, produce un aumento de sensibilidad al tamoxifeno. CGP significa CGP57380.

60 La figura 10 muestra que el tratamiento con EB1 reduce los niveles de PD-L1 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB231. A tasas comparables de inhibición de la fosforilación de eIF4E, EB1 es igual de fuerte o superior al inhibidor de MNK eFT508 y CGP57380.

La figura 11 muestra la viabilidad celular bajo la inhibición combinada del AR y la fosforilación de eIF4E. (A) Inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de eIF4E después de 24 h de tratamiento con EB1 en 22Rv1. Efecto

65 sinérgico de EB1 y Enzalutamida con ensayos de viabilidad celular 22Rv1 (B-F). (B) Número de células viables

después de 72 h de tratamiento con combinaciones por pares expresado como porcentaje en relación con el control. (E) Datos de viabilidad celular presentados en forma de cuadrícula que muestra el porcentaje de células afectadas por cada combinación por pares de dosis de fármaco. (C) Combinaciones de fármaco con la mayor inhibición de la viabilidad celular (barras; media \pm EEM (error estándar de la media); n=3. *p<0,05, **p<0,01 prueba bilateral de la t de Student). (F) Índice de combinación (IC) presentado en forma de cuadrícula para cada combinación por pares de dosis de fármaco calculada por el método de Chou-Talalay a proporción no constante. (D) Gráficos de la fracción afectada frente al índice de combinación (IC).

La figura 12 muestra que la inhibición doble del AR y la fosforilación de eIF4E induce la muerte celular mediante apoptosis en las líneas celulares 22Rv1 (A) las células se trataron con vehículo (DMSO), enzalutamida, EB1 o una combinación (Combo) de ambas con las concentraciones indicadas durante 72 h. (B) Ensayos de apoptosis de la línea celular 22Rv1 después del tratamiento con las concentraciones indicadas de Enzalutamida, EB1 y la combinación de ambas durante 72 h, cuantificado mediante análisis de cromatina fragmentada/condensada después de tinción con yoduro de propidio. Los datos son la media de dos copias técnicas de un experimento \pm EEM ***p<0,001 prueba bilateral de la t de Student

Descripción detallada de la invención

Salvo que se especifique lo contrario, todos los términos utilizados en esta solicitud se entenderán en su significado habitual como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas de determinados términos y expresiones como se usan en la presente solicitud son como se exponen a continuación y pretenden aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones a menos que una definición expuesta expresamente de otro modo proporcione una definición más amplia.

Como se utiliza en el presente documento, los artículos indefinidos "un" y "uno/a" son sinónimos de "al menos uno/a" o "uno/a o más". Salvo que se indique lo contrario, los artículos definidos usados en el presente documento, tales como "el/la", también incluyen el plural del sustantivo.

La expresión "cáncer de órganos hormonodependientes" incluye cánceres de órganos que dependen de hormonas para su funcionamiento, en particular de hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos, progestágenos) para su función o incluso que segregan tales hormonas sexuales, como lo son los órganos reproductores y sexuales, entre los que se incluyen mama, ovario, endometrio, próstata y testículos. Dentro de estos cánceres de órganos hormonodependientes se incluyen: (a) los que son cánceres hormonodependientes, por tanto, cánceres que dependen de una hormona para crecer y/o sobrevivir, también denominados "hormonosensibles"; (b) cánceres que se independizan de las hormonas durante el avance de la enfermedad; y (c) cánceres hormonodependientes pero con origen en órganos hormonodependientes, tal como CMTN.

PD-1/PD-L1 significa "inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando". En el apartado de ejemplos se incluyen ensayos para determinar el efecto inhibitor, y el experto en la materia sabe también cómo someter a ensayo este efecto inhibitor.

La expresión "terapéuticamente eficaz" como se utiliza en el presente documento a lo largo de la presente descripción, se refiere a la cantidad de un compuesto o combinación de compuestos que, cuando se administra, es suficiente para impedir que se desarrollen, o aliviar en cierta medida, uno o más de los síntomas de la enfermedad que se está tratando. En esta descripción particular, es la cantidad de un compuesto, combinación de compuestos, o composición que produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto, tales como tratar el cáncer, en particular el cáncer de órganos hormonodependientes, incluyendo cáncer de mama y cáncer de próstata. La cantidad terapéuticamente eficaz exacta es una cantidad de la composición que producirá los resultados más eficaces en términos de eficacia terapéutica en un sujeto dado. La dosis específica de EB1 para obtener un beneficio terapéutico puede variar dependiendo de las circunstancias particulares del paciente individual incluyendo, entre otras, la estatura, el peso, la edad y el sexo del paciente, la naturaleza y el estadio de la enfermedad, la agresividad de la enfermedad y la vía de administración. La dosis específica de EB1 para obtener un beneficio terapéutico cuando se administra en las combinaciones, composiciones o kit de partes desvelados en el presente documento, puede variar en relación con la dosis específica del compuesto utilizado como agente activo único.

No hay ninguna limitación en cuanto al tipo de sal de los compuestos EB1 que puede utilizarse, siempre que sean veterinaria o farmacéuticamente aceptables cuando se usen con fines terapéuticos. La expresión "sales veterinaria o farmacéuticamente aceptables", abarca sales utilizadas comúnmente para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. La preparación de sales veterinaria o farmacéuticamente aceptables de los compuestos EB1 puede realizarse mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, pueden prepararse a partir del compuesto precursor, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ellos, el compuesto precursor EB1 con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados veterinaria o farmacéuticamente aceptable. Los compuestos EB1 y sus respectivas sales pueden diferir en algunas

propiedades físicas, pero son equivalentes para los fines de la presente invención.

El compuesto EB1 puede estar en forma sólida amorfa o cristalina como compuesto de solvatación libre o como solvatos (p. ej. hidratos) y está previsto que todas las formas estén dentro del alcance de la presente invención para el uso terapéutico propuesto y para las combinaciones desveladas. Los métodos de solvatación generalmente son conocidos en la técnica. En general, las formas solvatadas con disolventes farmacéutica o veterinariamente aceptables tales como agua, etanol y similares son equivalentes a las formas sin solvatar para los fines de la invención. En particular, el compuesto EB1 se usa de acuerdo con esta descripción como un sólido amorfo.

10 En todas las realizaciones de la invención referidas al E1, sus sales veterinaria o farmacéuticamente aceptables siempre se contemplan incluso si no se mencionan específicamente.

15 La expresión "excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables" se refiere a materiales, composiciones o vehículos que, desde el punto de vista veterinario o farmacéutico, son aceptables. Cada componente debe ser veterinaria o farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición veterinaria o farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con el tejido u órgano de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones en línea con una relación razonable entre beneficio/riesgo.

20 Las expresiones "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier mamífero, en particular, se refieren a seres humanos.

25 Cuando en esta descripción se utiliza la expresión "tratamiento del cáncer" su uso se refiere a cualquiera de los tratamientos y/o a la prevención del cáncer indicado, aunque no se indique expresamente.

30 Como se ha indicado anteriormente, un primer aspecto de la invención se refiere a la 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina (EB1) o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

35 Todos estos cánceres en los que se propone la 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, son cánceres también referibles por inhibición de MNK1 y MNK2, en la que se produce sobreexpresión de p-eIF4E. De hecho, otros cánceres en los que tiene lugar dicha sobreexpresión de p-eIF4E, y también desvelados (pero no reivindicados) en el presente documento, se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, sarcoma, leucemia, linfomas y tumores cerebrales (es decir, glioma). En todos estos cánceres que pueden tratarse con EB1 o con una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de misma, la sobreexpresión de p-eIF4E se induce por tratamientos seleccionados del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

40 Dentro de los cánceres de órganos hormonodependientes, los cánceres hormonodependientes suelen tratarse principalmente bloqueando la interacción de las hormonas con los receptores celulares correspondientes en las células tumorales. Esto hace que esa vía de respuesta al estrés se active y lleve a las células cancerosas a evadir el tratamiento (resistencia al tratamiento), ya que dichas células tumorales dejan de ser sensibles. Estos cánceres resistentes son aquellos que se han independizado de las hormonas durante el avance de la enfermedad y su tratamiento supone un reto. Por último, los cánceres hormonodependientes que se originan en órganos hormonodependientes, tales como CMTN, son cánceres que, como tales, no responden a la terapia hormonal o antihormonal, porque carecen de receptores hormonales o expresan receptores que carecen del dominio de unión hormonal o antihormonal.

45 Por tanto, en una realización particular del primer aspecto, EB1 o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio, en una población de sujetos que han desarrollado resistencia, o que son, como tales, resistentes a la quimioterapia dirigida y/o resistentes a la inmunoterapia comúnmente utilizada para estos cánceres.

50 Por "quimioterapia dirigida" debe entenderse que el cáncer se trata utilizando fármacos dirigidos a genes y proteínas específicos que intervienen en el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas. La terapia dirigida puede afectar al entorno tisular que ayuda a un cáncer a crecer y sobrevivir o puede dirigirse a células relacionadas con el crecimiento del cáncer, como las células de los vasos sanguíneos.

55 Esto es digno de mención en el caso del CMTN, como se ha mencionado, caracterizado por la ausencia ER, PR y HER-2, por lo que sólo se cura con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia sistémica. Se puede garantizar que en el CMTN la quimioterapia sistémica es eficaz, o que no se desarrolla resistencia (véanse los ejemplos a continuación), si se utiliza EB1 o una sal farmacéutica o veterinaria de la misma en este cáncer de mama concreto.

60

65

La mayoría de los carcinomas de mama son positivos a estrógeno y tienen mejor pronóstico, pero alto riesgo de recidivas tardías. De hecho, los pacientes se tratan con antiestrógenos durante muchos años. Y se están estudiando nuevos enfoques farmacológicos, incluida la combinación con inhibidores de mnk

- 5 Cabe destacar también el cáncer de próstata, especialmente en el contexto de resistencia a la castración, donde las células tumorales ya no están controladas por la supresión androgénica pero el AR sigue desempeñando un papel crítico, en muchos casos debido a la adquisición de alteraciones tales como amplificaciones, mutaciones activadoras en el dominio de unión a ligando (LBD, *ligand binding domain*) y variantes de corte y empalme, en particular las variantes constitutivamente activas que carecen del LBD (es decir, AR-V7). Dichas modificaciones del AR (receptor androgénico) permiten su activación en ausencia de hormonas y el desarrollo de resistencia clínica a fuertes terapias dirigidas al AR (es decir, enzalutamida, inhibidor del AR que se une al LBD del AR).

Por lo tanto, la EB1, o sus sales, se propone para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio, en pacientes no sensibles a las terapias comunes y/o en pacientes que, después del tratamiento con las terapias de uso común, desarrollan resistencia debido a un cambio en el fenotipo celular (desregulación de la síntesis de proteínas en respuesta al estrés celular). Ventajosamente, este enfoque permite volver a sensibilizar a los pacientes que han evolucionado hacia un perfil no respondedor, y hacer que la terapia dirigida común vuelva a ser eficaz.

20 Por tanto, en otra realización particular del primer aspecto, EB1 es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama y cáncer de próstata.

En otra realización más particular, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo (CMTN).

25 Además, en otra realización más particular, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, el cáncer de un órgano hormonodependiente es cáncer de próstata.

Incluso en otra realización particular del primer aspecto, la 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina (EB1) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como se ha indicado anteriormente, es tal como que el tratamiento comprende administrar 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina (EB1) o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con uno o más compuestos seleccionados de compuestos para quimioterapia y compuestos para inmunoterapia.

35 En una realización más particular cuando EB1 o una sal de la misma es para el uso mencionado junto con otros compuestos para quimioterapia o inmunoterapia, y opcionalmente junto con un o más características de las diversas realizaciones descritas anteriormente o a continuación a lo largo de toda la descripción, el tratamiento comprende la administración simultánea, concomitante, individual o secuencial de: (a) EB1, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y (b) compuestos seleccionados de compuestos para quimioterapia y compuestos para inmunoterapia.

En otra realización particular del primer aspecto, los compuestos quimioterápicos se seleccionan entre doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib y combinaciones de los mismos.

45 Incluso en otra realización particular, EB1 o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, es para su uso, como se ha desvelado en el primer aspecto, junto con doxorubicina.

Incluso en otra realización particular, EB1 o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, es para su uso, como se ha desvelado en el primer aspecto, junto con tamoxifeno.

50 Incluso en otra realización particular, EB1 o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, es para su uso, como se ha desvelado en el primer aspecto, junto con enzalutamida.

Incluso en otra realización particular, EB1 o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, es para su uso, como se ha desvelado en el primer aspecto, junto con docetaxel.

Además, en otra realización particular del primer aspecto, opcionalmente junto con cualquier realización anterior o posterior, los compuestos para inmunoterapia comprenden inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1).

60 Como ejemplos de inhibidores de PD1 se incluyen los autorizados pembrolizumab, nivolumab y cemiplimab. Otros ejemplos aún en fase experimental son partalizumab, camrelizumab (SHR1210), sintilimab (IBI308), tislelizumab (BGB-A317), toripalimab (JS 001), dostarlimab (TSR-042, WBP-285), INCMGA00012 (MGA012), AMP-224 y AMP-514 (MEDI0680).

65

Como ejemplos de inhibidores de PD-L1 se incluyen los autorizados atezolizumab, avelumab y durvalumab. Otros ejemplos aún en fase experimental son KN035, CK-301, AUNP12, CA-170 y BMS-986189.

- En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a nuevas combinaciones particulares de compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos con EB1, o con una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, tales como las combinaciones que comprenden:
- 5 a) una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1 o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y
 - 10 b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorrubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos; donde la combinación es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.
- 15 En una realización particular de este segundo aspecto, la combinación para su uso comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de enzalutamida y docetaxel. Estas combinaciones son en particular para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata.
- 20 Además en otra realización particular del segundo aspecto, la combinación para su uso comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de doxorrubicina y tamoxifeno. Estas combinaciones son en particular para su uso en el tratamiento del cáncer de mama, y más en particular, del cáncer de mama triple negativo.
- 25 Además en otra realización particular del segundo aspecto, la combinación para su uso comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de un inhibidor de PD-1 o PD-L1.
- Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica o veterinaria única que comprende:
- 30 a) una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y
 - b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorrubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos, junto con uno o
 - 35 más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables; donde la composición farmacéutica o veterinaria única es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.
- 40 En una realización particular de esta composición farmacéutica o veterinaria única para su uso, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de doxorrubicina.
- En otra realización particular de la composición farmacéutica o veterinaria única para su uso, comprende una cantidad
- 45 terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de tamoxifeno.
- En otra realización particular de la composición farmacéutica o veterinaria única para su uso, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad
- 50 terapéuticamente eficaz de enzalutamida.
- En otra realización particular de la composición farmacéutica o veterinaria única para su uso, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de docetaxel.
- 55 En otra realización particular de la composición farmacéutica o veterinaria única para su uso, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la proteína 1 de muerte celular programada.
- 60 En otra realización particular de la composición farmacéutica o veterinaria única para su uso, comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del ligando de la proteína 1 de muerte celular programada.
- En otra realización particular, opcionalmente junto con una o más características de las diversas realizaciones
- 65 descritas anteriormente o a continuación a lo largo de toda la descripción, la invención también se refiere a un envase

o kit de partes que comprende:

- i) una primera composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable la misma, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;
- 5 ii) una segunda composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;
- 10 iii) instrucciones para el uso en combinación de i) y ii);
donde la primera y segunda composiciones son composiciones distintas, donde el envase o kit de partes es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

- 15 La selección de la formulación veterinaria o farmacéutica dependerá de la naturaleza del compuesto activo y de su vía de administración. Puede usarse cualquier vía de administración, por ejemplo, administración oral, parenteral y tópica.

Por ejemplo, la composición veterinaria o farmacéutica puede formularse para administración oral y puede contener uno o más transportadores o excipientes fisiológicamente compatibles, en forma sólida o líquida. Estas preparaciones
20 pueden contener ingredientes convencionales tales como agentes aglutinantes, materiales de relleno, lubricantes y agentes humectantes aceptables.

La composición veterinaria o farmacéutica puede formularse para administración parenteral junto con transportadores líquidos inyectables convencionales, tales como agua o alcoholes adecuados. En dichas composiciones pueden
25 incluirse excipientes farmacéuticos o veterinarios convencionales para inyección, tales como agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y tampones. Estas composiciones farmacéuticas o veterinarias pueden inyectarse por vía intramuscular, intraperitoneal o intravenosa.

La composición farmacéutica puede formularse para administración tópica.

30 Las formulaciones incluyen cremas, lociones, geles, polvos, soluciones y parches, donde el compuesto se dispersa o disuelve en excipientes adecuados.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma, incluyendo, entre otras, comprimidos, gránulos,
35 cápsulas, soluciones acuosas u oleosas, suspensiones, emulsiones o formas secas en polvo adecuadas para su reconstitución con agua u otro medio líquido adecuado antes de su uso, para su liberación inmediata o retardada.

De acuerdo con el tipo de formulación que se esté preparando, los expertos en la materia pueden determinar con facilidad cuales son los excipientes y/o transportadores apropiados.

40 Forma parte de la invención, la combinación, composición veterinaria o farmacéutica única, envase o kit de partes que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y uno o más de los compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos enumerados anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o la prevención del cáncer en un sujeto que lo necesite, como se define en las reivindicaciones. En
45 un aspecto de la divulgación, pueden ser para su uso en cánceres seleccionados del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de colon, cáncer de próstata, melanoma, sarcoma, leucemia, linfomas y tumores cerebrales, incluido el glioma. De acuerdo con la invención, son para su uso en el tratamiento de cánceres de órganos hormonodependientes en un sujeto que lo necesite, como se define en las reivindicaciones. Más en particular, para su uso en un cáncer de mama y próstata en un sujeto que lo necesite.

50 Por tanto, cualquiera de las combinaciones seleccionadas del siguiente grupo es, en particular, para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio:

- la combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1 y una cantidad terapéuticamente eficaz
55 de uno o más de enzalutamida y docetaxel;
- la combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de doxorubicina y tamoxifeno; y
- la combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1 y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de un inhibidor de PD-1 o PD-L1.

60 También forma parte de la divulgación (pero no de la invención reivindicada) el uso de una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de EB1, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y uno o más de los compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos se seleccionan del grupo que consiste en doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte
65 celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos, junto con uno o más excipientes o

transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables; para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio. Más en particular, para el tratamiento y/o la prevención de cáncer de mama y de próstata.

5

A lo largo de toda la descripción y en las reivindicaciones la palabra "comprende" y variaciones de la misma, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Así mismo, la palabra "comprende" abarca el caso de "consiste en". Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o podrán conocerse con la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención. La invención es como se define en las reivindicaciones.

10

Ejemplos

15 Ejemplo 1. Síntesis de 4,6-difenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-amina (EB1)

El 4,6-difenil-2-metoxinicotinonitrilo (Journal of Heterocyclic Chemistry, 26(6), 1665-73; 1989) (0,6 mmol) se disuelve en 4 ml de 1,4-dioxano junto con POBr₃ (1,34 mmol), piridina-HBr (0,015 mmol) y H₃PO₄ (0,026 mmol). La mezcla se calienta a reflujo durante 18 horas a 120 °C. La reacción se detiene añadiendo agua fría y se neutraliza con NaOH (6 M). El sólido obtenido se filtra y se lava con agua fría para obtener 4,6-difenil-2-bromonicotinonitrilo con un rendimiento del 84 % y como un sólido blanco, p. f.: 123-125 °C; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,26 (s, 1H), 8,26-8,22 (m, 2H), 7,82-7,77 (m, 2H), 7,63-7,60 (m, 3H) y 7,59-7,55 (m, 3H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 159,3, 156,2, 144,4, 135,5, 135,3, 131,3, 130,5, 129,1, 128,9, 127,7, 119,7, 116,5, 109,7; IR (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 3432, 3029, 2225, 1649, 1575, 1517, 1493, 1419, 1373, 772, 747, 702, 686; MS (70 eV, EI) m/z (%): 336,1 (96 %), 335,1 (68 %), 334,1 (100 %), 333,1 (52 %), 286,2 (36 %), 285,2 (46 %), 255,1 (69 %), 254,1 (20 %), 253,1 (31 %), 228,1 (26 %), 227,1 (55 %), 100,1 (20 %), 77,1 (43 %), 51,0 (22 %); Análisis elemental: calculado para C₁₈H₁₁BrN₂: C: 64,50 %, H: 3,31 %, N: 8,36 %; obtenido: C: 64,83 %, H: 3,58 %, N: 8,31 %.

A continuación, en un vial de microondas de 5 ml se añaden 4,6-difenil-2-bromo-nicotinonitrilo (0,18 mmol) e hidrazina monohidrato (0,36 mmol) y se disuelven en 3 ml de MeOH. La mezcla se calienta con irradiación al microondas durante 2 horas a 140 °C. El disolvente se elimina a presión reducida. El sólido obtenido se resuspende en MeOH, se filtra y se lava con metanol frío para obtener 4,6-difenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-amina que se purifica por cromatografía en columna (Cy: gradiente de AcOEt 0 % a 20 % en 10 minutos, 20 % isocrático durante 5 minutos, 20 % a 100 % en 15 minutos). Rendimiento del 71 %, sólido amarillento, p. f.: 219-220 °C; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 12,37 (s, 1H), 8,21 - 8,15 (m, 2H), 7,73 - 7,67 (m, 2H), 7,63 - 7,47 (m, 7H), 4,56 (s, 2H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 155,5, 153,3, 147,2, 145,4, 138,9, 137,2, 129,2, 128,9, 128,8, 128,8, 128,7, 127,2, 112,4, 102,0; IR (KBr) ν_{máx} (cm⁻¹): 3423, 3297, 3193, 1737, 1623, 1591, 1567, 1525, 1401, 1354, 1292, 702; MS (70 eV, EI) m/z (%): 287,1 (21 %), 286,1 (100 %), 285,1 (38 %); Análisis elemental: calculado para C₁₈H₁₄N₄: C: 75,50 %, H: 4,90 %, N: 19,60 %; obtenido: C: 75,43 %, H: 4,90 %, N: 19,56 %.

40

El EB1 sintetizado tal como se ilustra en este Ejemplo 1 es el que se usa en los siguientes Ejemplos 2-6.

Ejemplo 2. Efecto inhibidor de EB1

45 Materiales y métodos:

Ensayo de actividad quinasa:

La actividad quinasa del compuesto se midió mediante un ensayo radiométrico para quinasa (³³PanQinase® Activity Assay) realizado por Proqinase (www.proqinase.com).

50

Los ensayos se realizaron en FlashPlates™ de 96 pocillos de PerkinElmer (Boston, MA, EE.UU.) con un volumen de reacción de 50 µl. El cóctel de reacción se pipeteó en 4 etapas: (1) 20 µl de tampón, (2) 5 µl de solución de ATP (en H₂O), (3) 5 µl de compuesto (en DMSO al 10 %) y (4) 20 µl de mezcla enzima/sustrato. Por último, el cóctel contenía HEPES-NaOH 70 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, MnCl₂ 3 mM, ortovanadato de sodio 3 µM, DTT 1,2 mM, 50 µg/ml PEG₂₀₀₀₀, ATP (1 µM para MNK1 y 0,3 µM para MNK2), [γ-³³P] -ATP (aprox. 1,2 x 1006 cpm por pocillo), proteína quinasa (cantidades variables según el lote) y sustrato (2 µg/50 µl).

55

Los cócteles de reacción se incubaron a 30 °C durante 60 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de H₃PO₄ (v/v) al 2 %, las placas de aspiraron, se lavaron dos veces con 200 µl de NaCl al 0,9 % (p/v) y se determinó la incorporación de ³³Pi (contador de centelleo de microplacas MicroBeta, Wallac). Todos los ensayos se realizaron con un sistema Beckman Coulter/SAGIAN™.

60

La actividad residual (en %) de cada pocillo de una placa particular se calculó mediante la siguiente fórmula (siendo el control alto la actividad de la quinasa en ausencia de inhibidor y el control bajo el valor de radioactividad del sustrato

65

ES 3 014 017 T3

en ausencia de quinasa).

Res. Actividad (%) = $100 \times [(señal\ del\ compuesto - control\ bajo) / (control\ alto - control\ bajo)]$

- 5 Para explorar los compuestos, se analizó la actividad residual de ambas quinastas tras el tratamiento con 10 μ M de los compuestos.

Para medir la CI_{50} , la actividad residual las quinastas se analizó a 10 concentraciones diferentes en un intervalo de $5 \cdot 10^{-4}$ M a $1,5 \cdot 10^{-9}$ M.

10

Para estudiar la selectividad, la actividad residual se midió a 1 μ M a partir de un panel de 320 quinastas.

Cultivo celular:

- 15 Se cultivaron células MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7 y A375M, IMR-90 (IMR-90 (ATCC® CCL-186™) disponibles en el comercio a 37 °C y con CO₂ al 5 % en medio DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco, 4,5 g/l de glucosa; 30 mg/l de L-Glutamina (Gibco)) complementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycinina.
- 20 Las células MCF10A (también disponibles en el comercio) se cultivaron en medio DMEM/F-12 (medio de Eagle modificado de Dulbecco: 3,125 g/l de D-Glucosa, 365 mg/l de L-Glutamina, Mezcla de Nutrientes F-12 (Gibco)) complementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycinina, L-Glutamina (Cambrex) al 1 %, 10 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich), 0,005 mg/ml de insulina (Sigma), 100 ng/ml de hidrocortisona (Sigma) y 20 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico, Sigma).
- 25 Las células MV4-11 se cultivaron en medio IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove, Gibco) complementado con FBS al 10 %, L-glutamina al 1 %, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycinina.

Ensayos de proliferación *in vitro*:

- 30 En placas de 96 pocillos, se sembraron 5000 células para cada condición. Después de 24 h, las células se trataron con el compuesto a la concentración correspondiente. Las reservas de compuestos se prepararon en DMSO al 100 % a una concentración 200 veces más concentrada que la concentración del tratamiento. Por tanto, en todos los casos, la concentración final de DMSO en el medio es del 0,5 %. Después de la incubación, se eliminó el medio y las células se fijaron con PFA al 4 % (100 μ l por pocillo) durante 30 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS.

35

Las células se tiñeron con cristal violeta (0,5 % en EtOH): se añadieron 100 μ l a cada pocillo, se agitó durante 15 minutos, se lavó con agua y se dejó secar. El contenido de cada pocillo se disolvió en 200 μ l de AcOH al 15 % y se midió su absorbancia a 595 nm.

- 40 *Ensayos in vitro* de la inhibición de la fosforilación de eIF4E:

La inhibición de la fosforilación de eIF4E se cuantificó mediante transferencia Western. Las células se sembraron en placas de 60 mm (700.000 células durante 24 h, 500.000 células durante 48 h y 300.000 células durante 72 h). Después de 24 h, se añadieron los tratamientos. Las reservas de compuestos se prepararon en DMSO al 100 % a una concentración 200 veces más concentrada que la concentración del tratamiento. Por tanto, en todos los casos, la concentración final de DMSO en el medio fue del 0,5 %.

45

Después de la incubación, se eliminaron las proteínas y se realizó transferencia Western. En hielo, las placas se lavaron con PBS y las células se sometieron a lisis con 60 μ l de tampón de lisis (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, Tritón 100x al 0,1 %, pH 7,5 complementado con inhibidores de proteasa (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem) e inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II, Calbiochem)). Las muestras se centrifugaron a 15.000 g y el sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford. Todas las muestras se diluyeron a la misma concentración con un tampón de lisis y un tampón de carga (tampón Laemmli) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95 °C. Las proteínas se separaron en un gel de agarosa al 12 % (se cargaron 20 μ g por pocillo) y se transfirieron a una membrana de PDVF (fluoruro de polivinilideno). Se utilizaron los anticuerpos de β -actina, abreviado como "actina" en las figuras (Calbiochem), eIF4E (anti-conejo, Cell signalling) y eIF4E fosforilado (S209) (anti-conejo, Cell signalling) en BSA al 5 % en TBST para estudiar la actividad de los compuestos. La selectividad frente a MNK se analizó con los anticuerpos de ERK, p-ERK, MNK1, p-MNK1, 4EBP1 y p-4EBP1.

55

60 Resultados:

La presente invención se refiere a la *H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina

- EB1, o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como inhibidor selectivo de MNK para su uso en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo y otros cánceres referibles con sobreexpresión de p-eIF4E debido a

65

una mayor actividad de MNK, como se define en las reivindicaciones. Como ya se había anunciado, y sorprendentemente, EB1 tiene una CI_{50} enzimático de 0,7 μM y una CE_{50} *in vitro* de aproximadamente 1,5 μM en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). La inhibición completa de la fosforilación de eIF4E se consigue sin efectos citotóxicos y con alta selectividad. Además, los resultados son independientes de la línea celular.

5 Del mismo modo, EB1 aumenta la sensibilidad de las células tumorales MDA-MB-231 a la quimioterapia cuando se combina con doxorubicina (o abreviado como DOXO en esta descripción).

Estos resultados son especialmente sorprendentes y relevantes ya que los resultados de otros derivados estudiados con diversos sustituyentes incluidos en los anillos fenílicos en las posiciones C4 y C6 del sistema 1*H*-pirazolo[3,4-
10 b]piridin-3-amina, han presentado actividades inferiores a las de EB1.

Los resultados del ensayo enzimático radiométrico realizado por Proqinase® (<https://www.proqinase.com/>) indican que la actividad residual de las quinasas MNK1 y MNK2 tras el tratamiento con 10 μM de EB1 es del 14 % y del 52 %, respectivamente. Estos resultados indican una cierta selectividad por MNK1. En el mismo ensayo, los resultados
15 obtenidos por los compuestos de referencia cercosporamida y CGP57380 son, por un lado, del -1 % y 0 % y, por otro lado, del 21 % y 39 %.

Como se muestra en la figura 1, EB1 inhibe la fosforilación de eIF4E con una CE_{50} *in vitro* de ~ 1,5 μM con una inhibición casi completa a partir de 2,5 μM . El efecto es rápido y dura al menos 72 h. Además, en los tiempos ensayados
20 no hay diferencia si el compuesto se renueva cada 24 h o 48 h.

EB1 reduce significativamente la fosforilación de eIF4E a concentraciones superiores a 2,5 μM . Esta reducción no está causada por una disminución de la cantidad total de eIF4E según el análisis de transferencia Western. Este efecto parece deberse a la inhibición directa de las MNK, ya que el tratamiento no afecta a ninguno de los componentes de
25 la vía de señalización (figura 1).

EB1 no altera el estado de fosforilación de las MNK. Además, ERK, la quinasa posterior de la vía de señalización de MAP quinasa, no se ve afectada en las células de control ni en las tratadas con EB1.

30 Por último, la fosforilación de la proteína de unión a eIF4E (4E-BP1) tampoco se ve alterada por el compuesto (figura 1). Resumiendo, los datos indican que la disminución de la fosforilación de eIF4E en las células tratadas con EB1 se debe a la inhibición directa de las quinasas MNK.

El efecto de EB1 se probó también en células mamarias inmortalizadas no tumorales (MCF10) con resultados similares
35 (CE_{50} = 0,7 μM) (figura 2).

Basándose en que los ratones con genes inactivados (*knockout*) de MNK1/2 (son viables, y sin estar ligados a ninguna teoría, se propone que ambas proteínas no son esenciales para las funciones celulares básicas. Esto también se ve respaldado por el hecho de que la supresión de ambas proteínas mediada por ARNhc no altera la viabilidad ni el
40 crecimiento celular. Basándose en estos datos, predecimos que no se espera que los inhibidores de MNK reduzcan el crecimiento celular. Por lo tanto, se comprueba si EB1 afecta al crecimiento celular en concentraciones, que son suficientes para inhibir la fosforilación de eIF4E.

Como se muestra en la figura 3, en células de CMTN (MDA-MB-231) y en células mamarias no tumorales (MCF10),
45 es posible inhibir la fosforilación de eIF4E sin alterar el crecimiento celular y observando únicamente una reducción significativa del número de células a las concentraciones más altas.

Para determinar cómo se ve afectado el crecimiento celular a mayores concentraciones de EB1, se realizó un análisis FACS para monitorizar el estado del ciclo celular y el porcentaje de células en fase subG1 como indicador de muerte
50 celular. Como control positivo de muerte celular, se trataron con doxorubicina 100 nM, lo que provocó un fuerte aumento de las células en fase subG1. A diferencia de la doxorubicina, concentraciones de hasta 40 μM de EB1 no provocaron un aumento de la muerte celular. En cambio, se observó un aumento del número de células en la fase G1 del ciclo celular, de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, estos resultados, indican que la reducción del crecimiento celular a las concentraciones más altas de EB1 se debe a un retraso en el avance del ciclo celular y no a
55 la inducción de la muerte celular. Se han descrito resultados equivalentes para el inhibidor de MNK1/2, BAY 11433296 (figura 4).

Resumiendo, EB1 no afecta al crecimiento celular de células tumorales y no tumorales a las concentraciones necesarias para inhibir la actividad MNK, lo que respalda el modo de acción selectivo hacia MNK y proporciona una
60 primera indicación de un modo de acción seguro en futuros estudios clínicos.

Para examinar el modo de acción selectivo, se evaluó la actividad de EB1 frente a un panel de diferentes quinasas (Proqinase®) (figura 5). EB1 muestra una excelente selectividad a 1 μM en un panel de 320 quinasas, ya que sólo
65 otras 16 quinasas se ven afectadas de una manera equivalente. Un estudio de la bibliografía revela que ninguna de las otras quinasas afectadas está implicada en vías que afecten a la fosforilación de eIF4E.

Las revisiones de los inhibidores de MNK descritos anteriormente suelen describir efectos específicos para una línea celular determinada. Para comprobar si también es el caso de EB1, se realizaron curvas de valoración en líneas celulares de diferentes tipos de tumores, tales como células de leucemia (MV4-11), células de melanoma (A375M) y 5 células de cáncer de mama (MDA-MB-468).

EB1 es activo en todas las líneas celulares analizadas, lo que demuestra que la actividad de dicho compuesto como inhibidor de MNK no depende de la línea celular (figura 6).

10 La inhibición de la fosforilación de eIF4E mediante MNK ha surgido como una nueva estrategia contra el cáncer, especialmente junto con otras terapias aprobadas. El tratamiento con inhibidores de MNK permite sensibilizar las células tumorales a las terapias habituales. Estos nuevos esquemas de tratamiento también son importantes para los tipos de cáncer en los que no se dispone de terapias dirigidas, tal como el cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, hasta ahora, no se han descrito ejemplos del uso de inhibidores de MNK para sensibilizar el cáncer de mama 15 triple negativo a quimioterapias aprobadas.

La combinación de EB1 con doxorubicina en células MDA-MB-231 muestra resultados prometedores. Se ha confirmado el aumento de la fosforilación de eIF4E causado por el estrés celular debido al tratamiento con doxorubicina y que puede invertirse con 5 μ M de EB1 (figura 7A).

20 Además, el tratamiento junto con EB1 sensibiliza las células MDA-MB-231 a la doxorubicina, aumentando el efecto de la misma sobre el crecimiento celular. La CI_{50} de la doxorubicina pudo reducirse junto con EB1 de 350 nM a 225 nM (figura 7B).

25 Todos estos resultados confirman el uso de la 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina (abreviada como EB1), o de una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, como inhibidor selectivo, no citotóxico de MNK1 y MNK2.

Ejemplo 3. EB1 no causa efectos adversos sobre el crecimiento celular y la mortalidad celular en la línea celular IMR90 como modelo de células no tumorales.

30 Los ratones con genes inactivados de las quinasas MNK1 y MNK2 dirigidas a EB1, son viables (Ueda et al 2004; PMID: 15254222). El tratamiento de células IMR90, fibroblastos no transformados, no provoca detención significativa del crecimiento celular (figura 8, A) y no induce la muerte celular (figura 8, B). El crecimiento celular se midió mediante el ensayo con cristal violeta. La muerte celular se determinó mediante tinción con yoduro de propidio (PI)/Hoechst y se determinó la proporción de células muertas (positivas a PI) entre todas las células analizadas (Hoechst). Como 35 control positivo se incluyó un tratamiento con cisplatino. Los resultados indican que no se espera que EB1 cause efectos adversos en las células sanas. Por lo tanto, es previsible que los efectos secundarios para los pacientes sean mínimos.

40 Ejemplo 4. El tratamiento con EB1 produce un aumento de sensibilidad al tamoxifeno

Estudios anteriores sugieren que la inhibición de las quinasas MNK por CGP57380 (CGP), un inhibidor que tiene muchas dianas, produce un aumento de sensibilidad al tamoxifeno (Geter et al, 2017; PMID: 29269484) en células MCF7. El tratamiento con EB1 de células MCF7 también produce un aumento de sensibilidad al tamoxifeno (figura 9).

45 El crecimiento celular en presencia de EB1, de tamoxifeno o de la combinación de ambos inhibidores, se midió mediante violeta de cristal. Los datos se normalizaron a los del control de vehículo.

Ejemplo 5. El tratamiento con EB1 produce una reducción de los niveles de PD-L1 en células MDA-MB231

50 Estudios previos con eFT508 en modelos de ratones singénicos, sugieren que la inhibición de las MNK produce una reducción de los niveles de expresión de PD-L1. El tratamiento con EB1 reduce los niveles de PD-L1 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. A tasas comparables de inhibición de la fosforilación de eIF4E, EB1 es igual de fuerte o superior al inhibidor de MNK eFT508 y CGP57380. Células MDA-MB-231 se trataron durante 48 h con las concentraciones indicadas de los inhibidores. se usó DMSO como control de vehículo. Se prepararon extractos 55 de proteínas y se realizaron análisis de transferencia Western. Los datos se representan en la figura 10.

Ejemplo 6. El tratamiento con EB1 aumenta la sensibilidad a la Enzalutamida en células de cáncer de próstata

El tratamiento conjunto de EB1 y Enzalutamida en la línea celular de cáncer de próstata resistente a la castración, 60 22Rv1 (comercializada en la ATCC® CRL-2505™) produjo un efecto sinérgico de la viabilidad celular.

Se evaluó la viabilidad celular bajo la inhibición combinada del AR y la fosforilación de eIF4E. Los resultados se muestran en la figura 11. En (A) se consiguió una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de eIF4E después de 24 h de tratamiento con EB1 en 22Rv1, determinada mediante análisis de transferencia Western. El efecto 65 sinérgico de EB1 y de Enzalutamida se investigó con el ensayo de viabilidad celular 22Rv1 (B-F). (B) Número de

células viables después de 72 h de tratamiento con combinaciones por pares expresado como porcentaje en relación con el control. (E) Datos de viabilidad celular presentados en forma de cuadrícula que muestra el porcentaje de células afectadas por cada combinación por pares de dosis de fármaco. (C) Combinaciones de fármaco con la mayor inhibición de la viabilidad celular (barras; media \pm EEM (error estándar de la media); n=3. *p<0,05, **p<0,01 prueba bilateral de la t de Student). (F) Índice de combinación (IC) presentado en forma de cuadrícula para cada combinación por pares de dosis de fármaco calculada por el método de Chou-Talalay a proporción no constante. (D e I) Gráficos de la fracción afectada frente al índice de combinación (IC).

Todos estos datos permiten concluir que la combinación que comprende EB1 o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma y enzalutamida, implica un efecto sinérgico en términos de reducción de la viabilidad celular de las células de cáncer de próstata.

La inhibición doble del AR y la fosforilación de eIF4E induce la muerte celular mediante apoptosis. Los resultados se ilustran en la figura 12. Con este objetivo, células 22Rv1 (A) se trataron con vehículo (DMSO), enzalutamida, EB1 o una combinación de ambos con las concentraciones indicadas durante 72 h. A continuación se prepararon lisados de células enteras y se sometieron a análisis de transferencia Western con los anticuerpos indicados. Se observó una reducción del AR, de su variante de corte y empalme AR-V7 y de la fosforilación de eIF4E después del tratamiento con EB1 solo y de forma más pronunciada con la combinación. El aumento de los niveles de Cl-PARP indicaba la inducción apoptótica bajo el tratamiento combinatorio. (B) Ensayos de apoptosis de la línea celular 22Rv1 después del tratamiento con las concentraciones indicadas de Enzalutamida, EB1 y la combinación de ambas durante 72 h, cuantificado mediante análisis de cromatina fragmentada/condensada después de tinción con yoduro de propidio. Se observó un aumento considerable de la población de células apoptóticas con el tratamiento doble. Se obtuvieron imágenes representativas de tinción con yoduro de propidio y Hoechst de la línea celular 22Rv1, aunque no se muestran los datos. Los datos son la media de dos copias técnicas de un experimento \pm EEM ***p<0,001 prueba bilateral de la t de Student

Listado de citas

Bibliografía de patentes

- 30 - US 2010/0113415
- WO 2011/019780
- WO 2015/004024
- DE 2160780

Bibliografía no de patentes

- 35 - Clin Cancer Res. 2007; 13:4429-4434
- Nat Rev Clin Oncol. 2016; 13:674-690
- Oncologist. 2011;16 Suppl 1:1-11 Breast Cancer Res. 2010; 12:212
- J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2008;26:1275-1281
- 40 - Lancet Lond. Engl. 2014;384:164-172
- J. Am. Soc. Clin. Oncol. 2012;30:1796-1804 Med. Oncol. Northwood Lond. Engl. 2017;35:13
- Clin Transl Oncol. 2014;16:937-1113.
- Oncotarget. 2015;6:24092-24104
- PLoS ONE. 2014;9:e89220
- 45 - J Cancer Res Clin Oncol. 2016;142:2309-2317
- J Neurooncol. 2016;131:485-493
- Virchows Arch. 2015;467:667-673
- Int J Clin Exp Pathol. 2015;8:3955-3962
- J Invest Dermatol. 2015;135:1358-1367
- 50 - Oncogene. 2015;34(16):2032-2042
- PLoS ONE. 2015;10(4):e0123352
- Mol Cell Biol. 2004;24(15):6539-6549
- Cancer Biol Ther. 2015;16(5):648-656
- Cancer Res. 2011;71:1849-1857
- 55 - Biochem. J. 2007;408(3):297-315
- Curr Med Chem. 2017;24(28):3025-3053.
- Oncotarget. 2012;3:118-131; Chem Biol. 2014;4:441-452
- Curr Med Chem. 2017;24(28):3025-3053
- J Med Chem. 2018;61(8):3516-3540
- 60 - Cancer Lett. 2017;390:21-29
- Geter et al, 2017; PMID: 29269484

REIVINDICACIONES

1. 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.
2. La 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el cáncer de un órgano hormonodependiente se selecciona entre cáncer de mama y cáncer de próstata.
3. La 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el cáncer de mama es cáncer de mama triple negativo.
4. La 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el cáncer de un órgano hormonodependiente es cáncer de próstata.
5. La 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con uno o más compuestos seleccionados entre compuestos para quimioterapia y compuestos para inmunoterapia.
6. La 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde los compuestos quimioterápicos se seleccionan entre doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, y combinaciones de los mismos.
7. La 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde los compuestos para inmunoterapia comprenden inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1).
8. Una combinación que comprende:
 - a) una cantidad terapéuticamente eficaz de 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y
 - b) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos;
 donde la combinación es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.
9. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y uno o más de enzalutamida y docetaxel.
10. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y uno o más de doxorubicina y tamoxifeno.
11. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, y uno o más de un inhibidor de la proteína 1 de muerte celular programada o su ligando (PD-1/PD-L1).
12. Una composición farmacéutica o veterinaria única que comprende, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables, una cantidad terapéuticamente eficaz de:
 - a) 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma; y
 - b) uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos;
 donde la composición farmacéutica o veterinaria única es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.
13. Un envase o kit de partes que comprende:
 - i) una primera composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de

- 4,6-difenil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-3-amina, o de una sal veterinaria o farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;
- ii) una segunda composición veterinaria o farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos quimioterápicos o inmunoterápicos seleccionados del grupo que consiste en doxorrubicina, tamoxifeno, enzalutamida, docetaxel, cisplatino, lapatinib, inhibidores de la proteína 1 de muerte celular programada y su ligando (PD-1/PD-L1), y combinaciones de los mismos, junto con uno o más excipientes o transportadores veterinaria o farmacéuticamente aceptables;
- iii) instrucciones para el uso en combinación de i) y ii);
- 5 donde la primera y segunda composiciones son composiciones separadas;
- 10 donde el envase o kit de partes es para su uso en el tratamiento de un cáncer de un órgano hormonodependiente seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio.

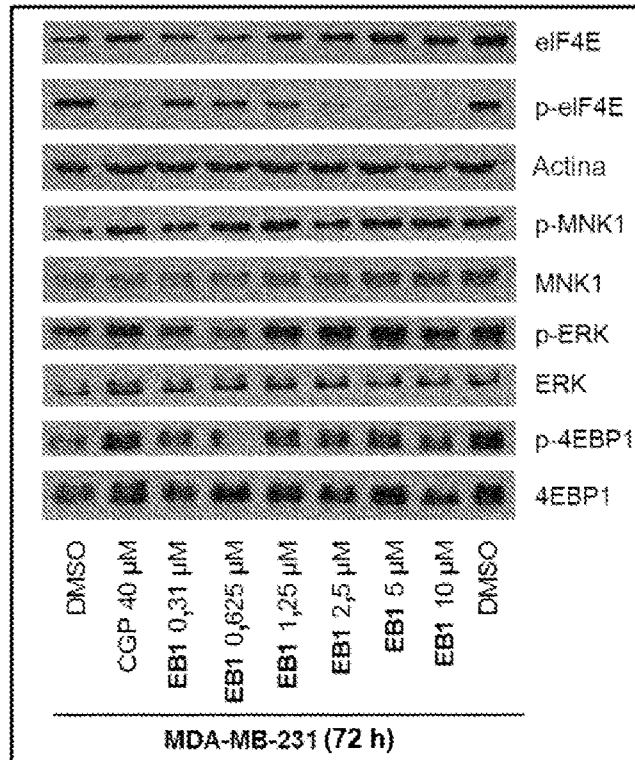


FIGURA 1

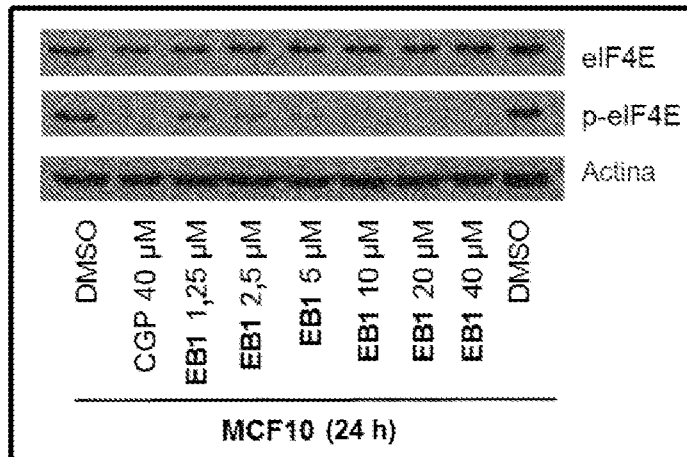
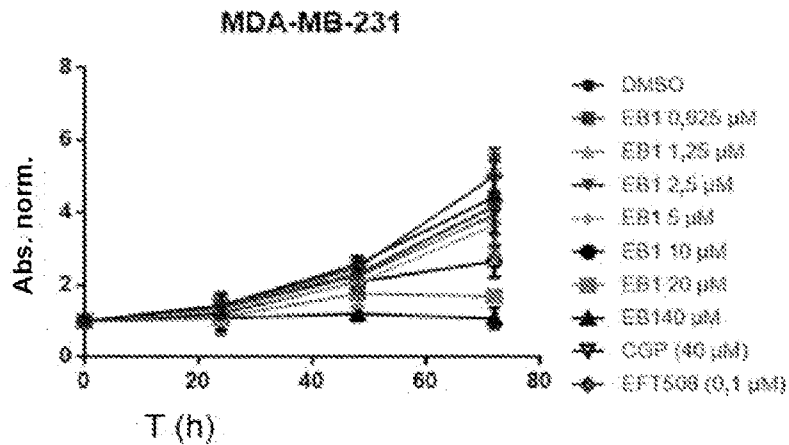
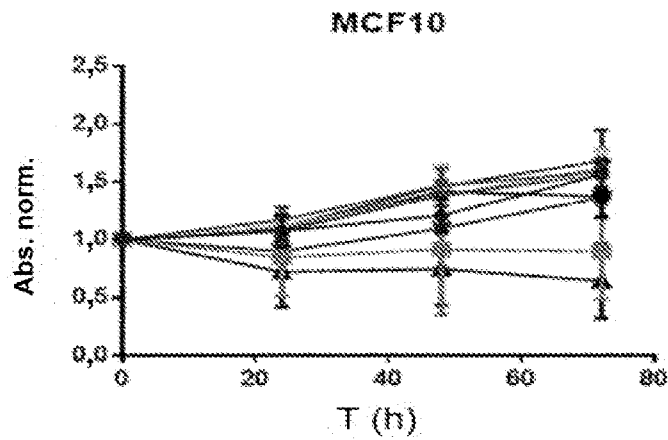


FIGURA 2



ANOVA bilateral			
Ensayo de Tukey (comparaciones múltiples)			
	24 h	48 h	72 h
DMSO frente a 5 μM	ns	ns	ns
DMSO frente a 10 μM	ns	ns	**
DMSO frente a 20 μM	ns	ns	****
DMSO frente a 40 μM	ns	*	****



ANOVA bilateral			
Ensayo de Tukey (comparaciones múltiples)			
	24 h	48 h	72 h
DMSO frente a 5 μM	ns	ns	ns
DMSO frente a 10 μM	ns	ns	ns
DMSO frente a 20 μM	ns	ns	**
DMSO frente a 40 μM	ns	ns	****

FIGURA 3

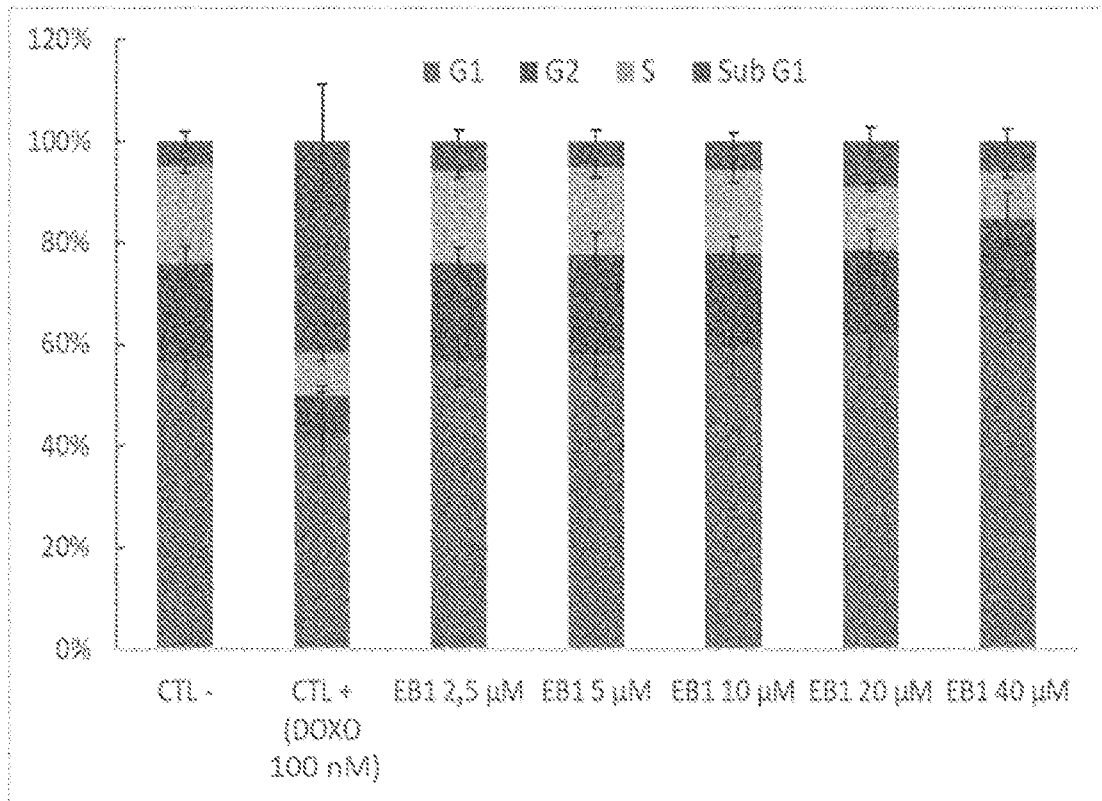


FIGURA 4

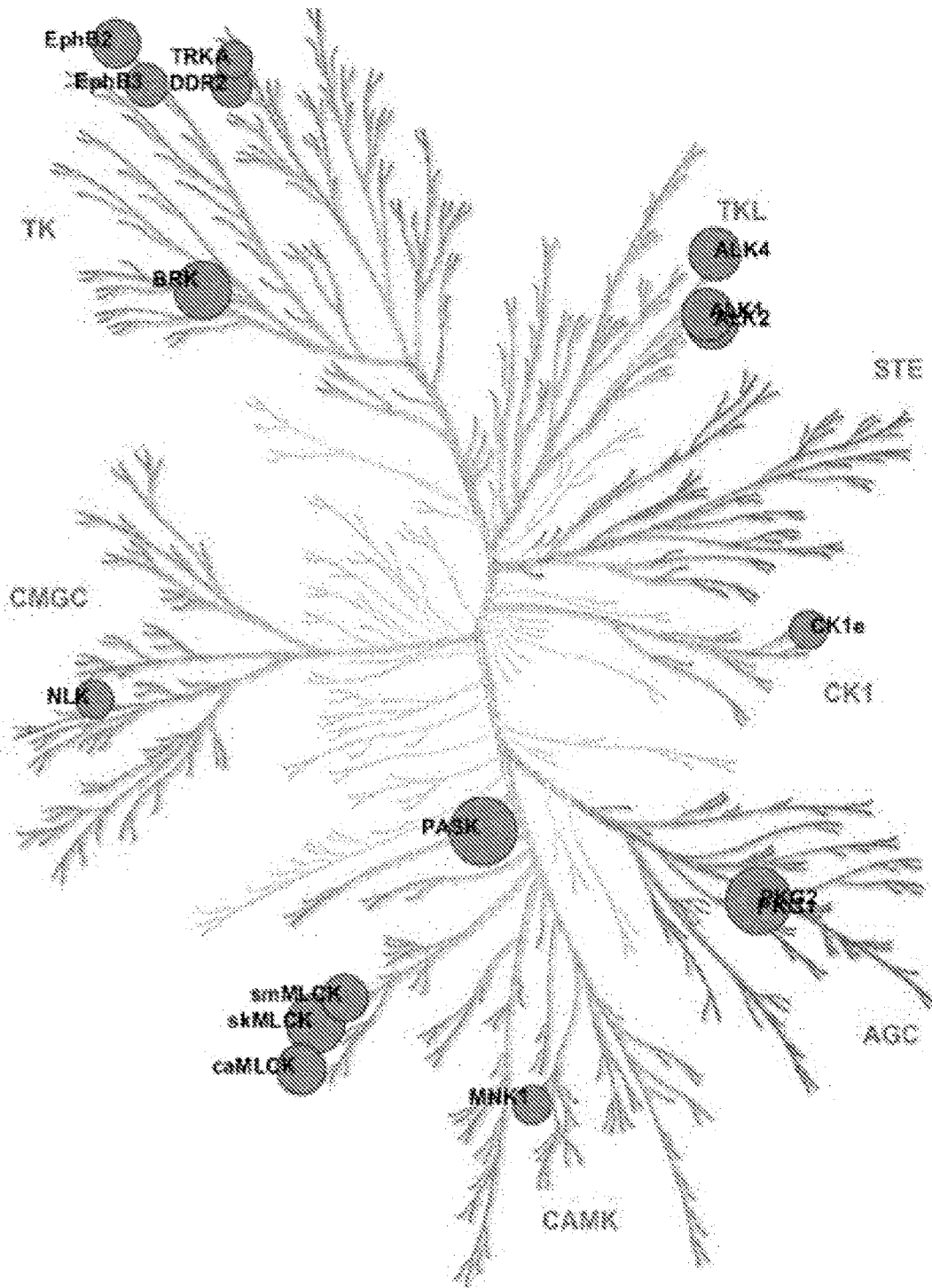


FIGURA 5

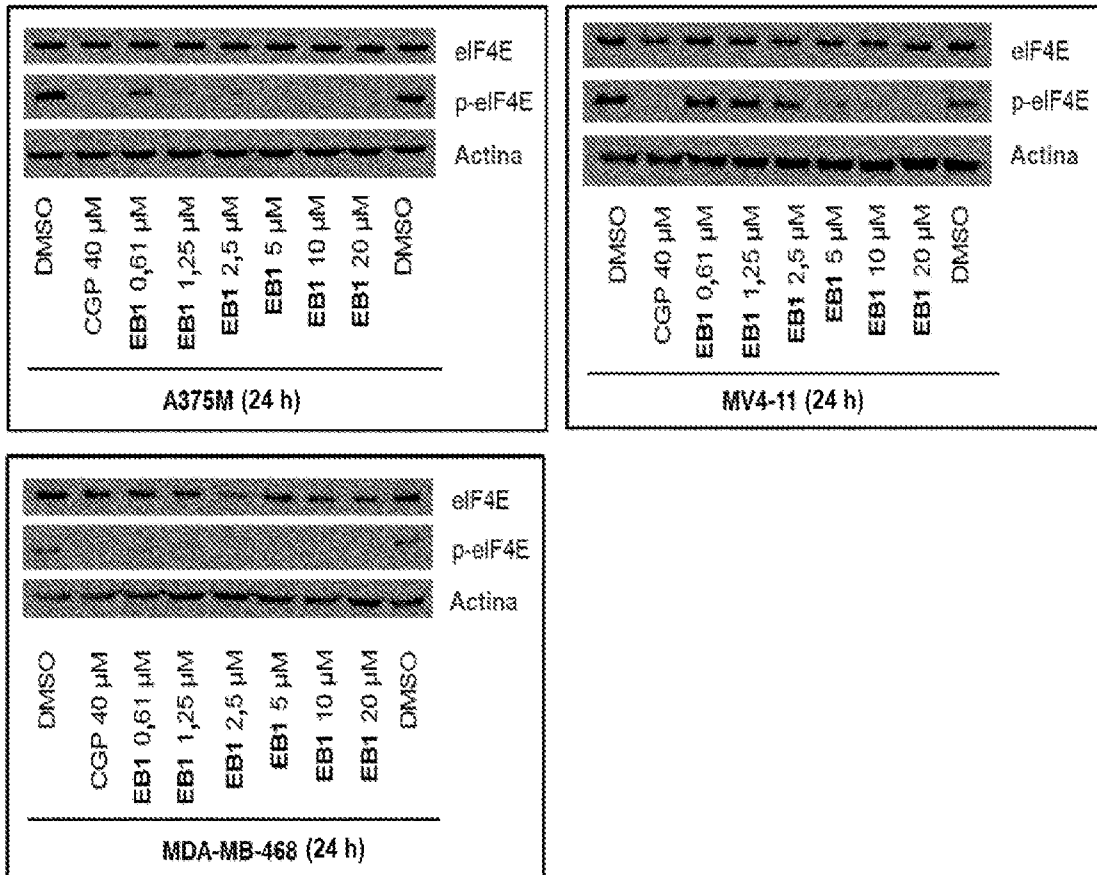


FIGURA 6

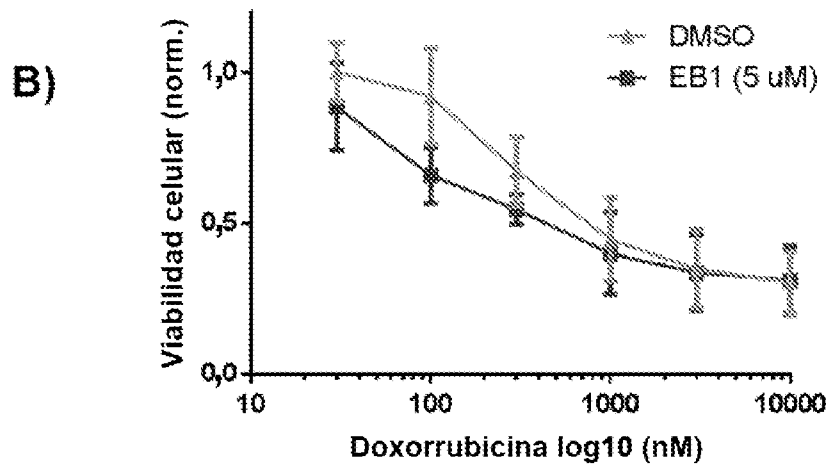
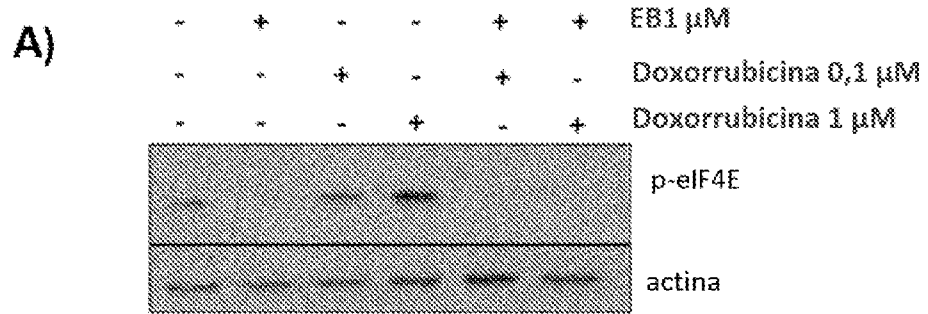


FIGURA 7

crecimiento celular

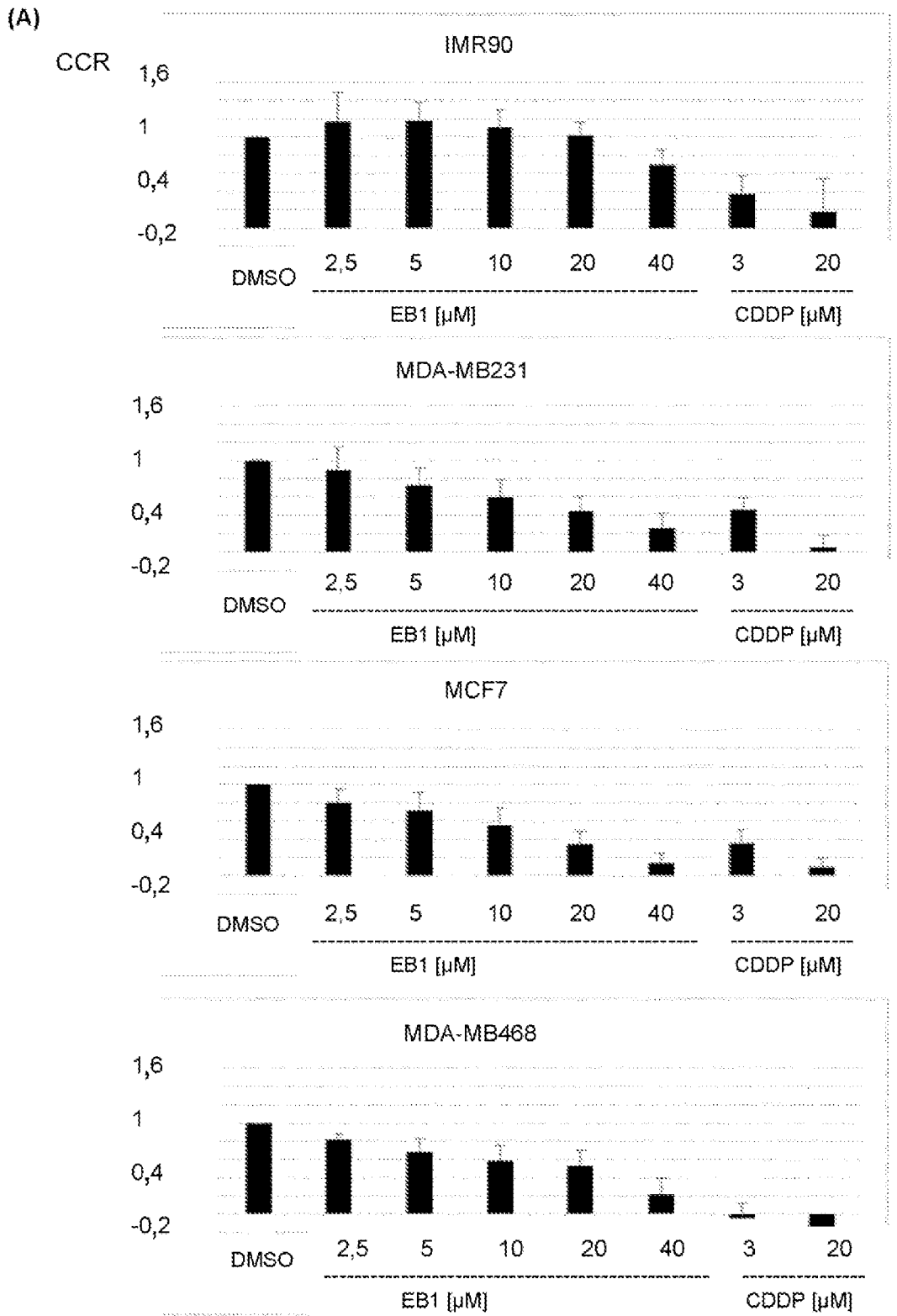
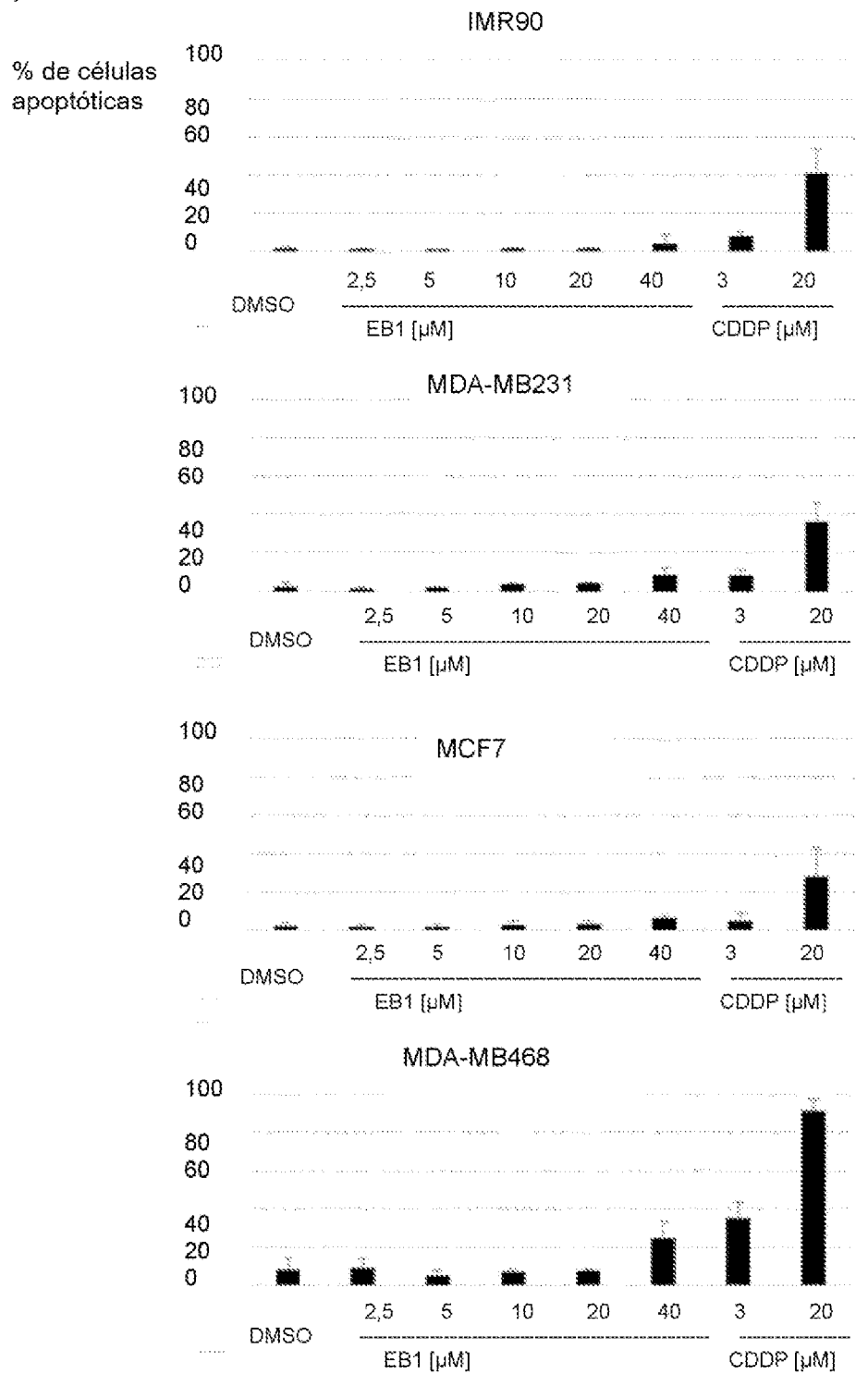


FIGURA 8

apoptosis

(B)



Cont. FIGURA 8

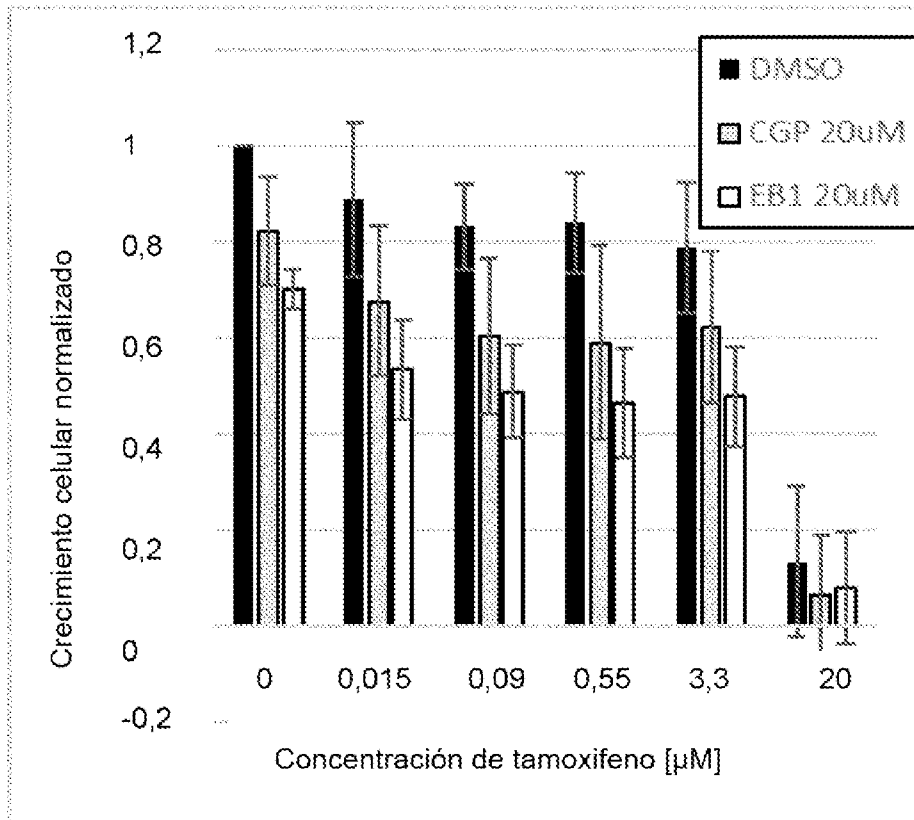


FIGURA 9

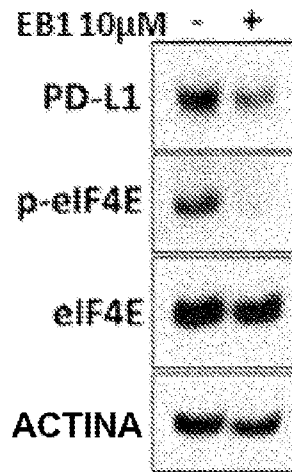


FIGURA 10

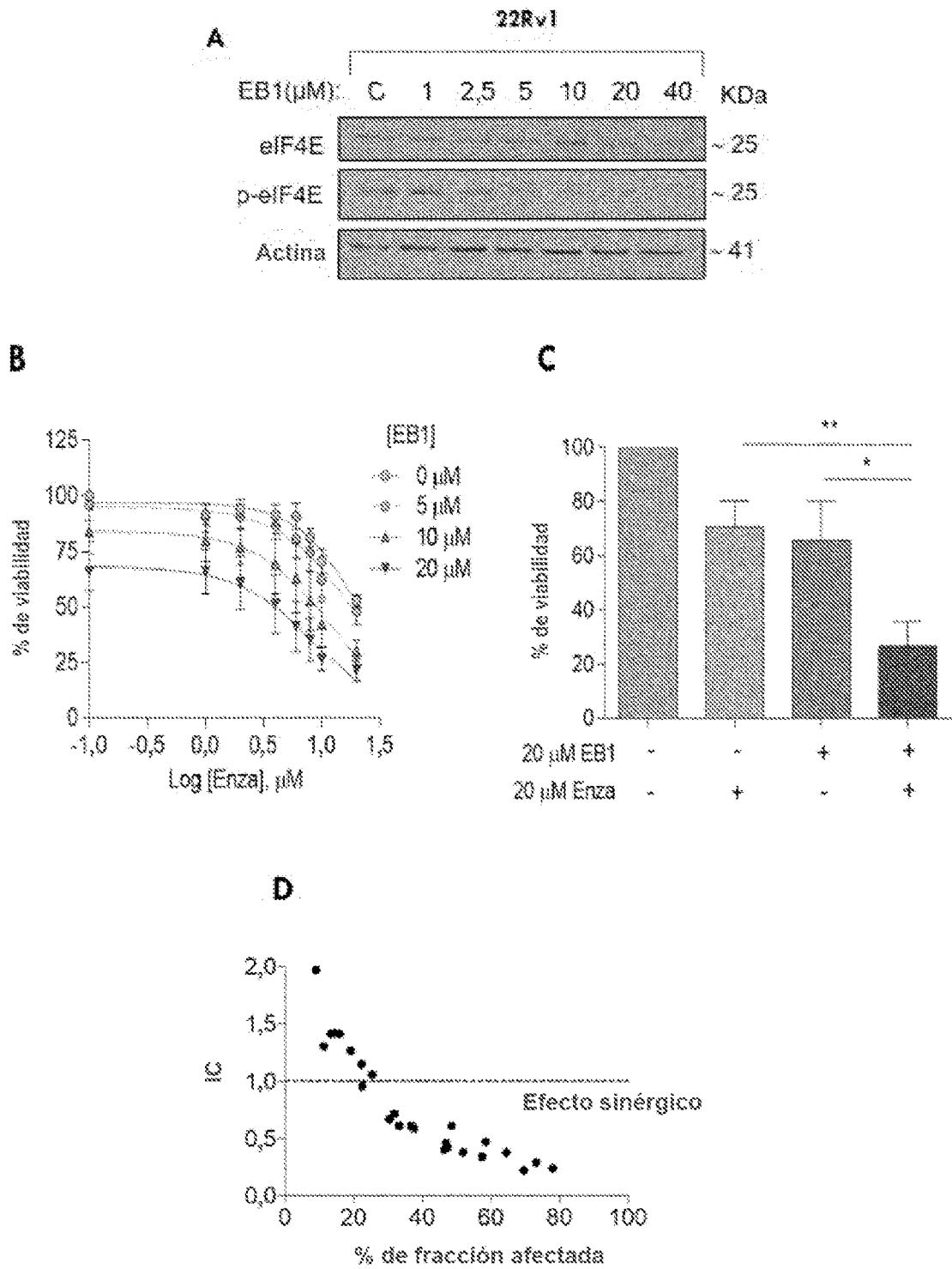


FIGURA 11

E

		Enzalutamida (μM)					
		C	5	10	15	20	30
EB1 (μM)	C	0	9	9	19	29	47
	1	1	11	15	23	33	46
	2,5	3	9	16	22	32	47
	5	4	13	19	25	38	52
	10	16	30	37	47	57	70
	20	34	48	58	65	73	78

Fracción afectada (%)

F

		Enzalutamida (μM)				
		5	10	15	20	30
EB1 (μM)	1	1,3	1,4	1,0	0,6	0,4
	2,5	2,0	1,4	1,1	0,7	0,4
	5	1,4	1,3	1,1	0,6	0,4
	10	0,7	0,6	0,5	0,3	0,2
	20	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2

Índice de combinación

Cont. FIGURA 11

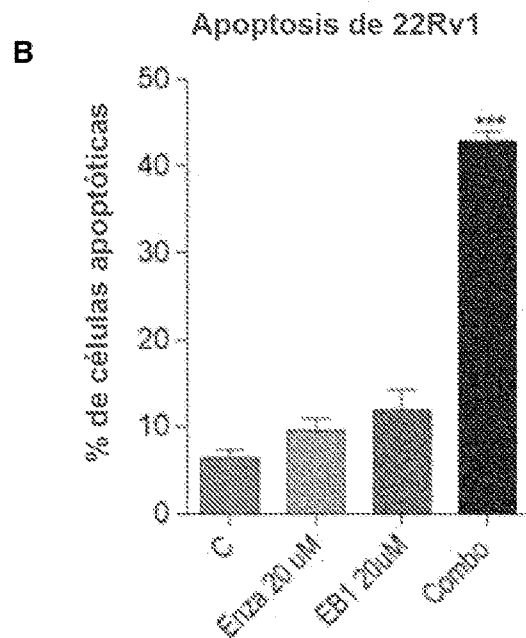
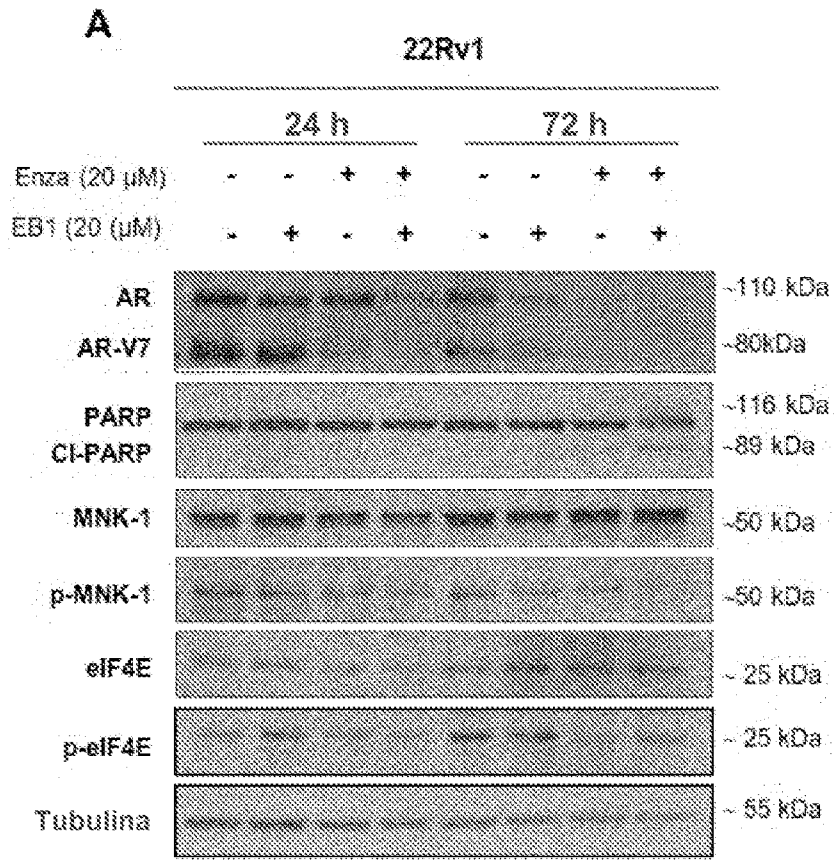


FIGURA 12