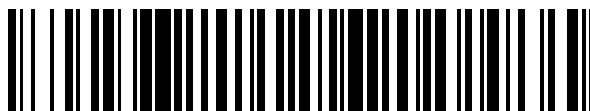


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 262**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/277 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/585 (2006.01)
A61K 33/34 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2018** **PCT/KR2018/000379**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018** **WO18128510**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2018** **E 18736528 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2022** **EP 3566705**

54 Título: **Composición para la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama**

30 Prioridad:

06.01.2017 KR 20170002180

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2023

73 Titular/es:

LEMONEX INC. (100.0%)
Sillim-dong, Seoul National University, 1 Gwanak-ro
Gwanak-gu
Seoul 08826, KR

72 Inventor/es:

LEE, JAE HO;
MIN, DAL HEE y
WON, CHEOL HEE

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 932 262 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

Composición para la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama

5

[Campo Técnico]

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico, a un adyuvante contra el cáncer para su utilización en la ayuda de eficacia terapéutica de un agente contra el cáncer para un cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama y a un complemento para la salud para su utilización en la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico.

[Técnica anterior]

15

El cáncer de ovario es un cáncer que tiene la mortalidad más alta entre todos los cánceres ginecológicos, y desde hace poco con el estilo de vida occidentalizado y el aumento de la población envejecida, la incidencia del cáncer de ovario ha aumentado progresivamente. En el caso de cáncer de ovario, el cáncer de ovario progresivo en como mínimo la fase III se descubre inicialmente en más del 70 % de pacientes debido a que los síntomas evidentes no aparecen en los primeros días, y se ha notificado que la recurrencia y la metástasis tienen lugar en un periodo de 2 años después del primer tratamiento en más de 75 % de los pacientes.

Los procedimientos para el tratamiento del cáncer de ovario se determinan de acuerdo con los tipos y las fases del cáncer y pueden incluir cirugía, quimioterapia, etc. Sin embargo, tales procedimientos no son significativamente eficaces en el tratamiento de cáncer metastásico debido a la recurrencia. Esto se debe a que la metástasis del cáncer implica la inducción de la neovascularización (angiogénesis) y migración celular, que son distintos del cáncer por sí solo desde el punto de vista de estado. Por ejemplo, para prevenir la metástasis de cáncer, es necesario inhibir la inducción de angiogénesis, así como la migración celular, y, por consiguiente, los efectos antimetastásicos son claramente distinguibles de los efectos contra el cáncer.

30

A menudo el cáncer de ovario evoluciona sin mostrar síntomas específicos y es difícil de detectar de forma temprana. Además, en el caso en que se confirma el cáncer de ovario, la mayoría de casos del cáncer se encuentran en las fases avanzadas y a menudo muestran metástasis peritoneal. Adicionalmente, dado que los ovarios se mueven libremente dentro de la pelvis, las células cancerosas pueden infiltrarse en los tejidos circundantes, o en comparación con otros cánceres, el cáncer de ovario posee una característica de metástasis más rápida. Debido a estos efectos, aproximadamente del 70 hasta el 75 % o más de todos los pacientes con cáncer de ovario se han diagnosticado con como mínimo cáncer de ovario avanzado de fase III. En particular, se conoce que las células de cáncer de ovario en fase terminal existen en una forma esférica, tal como masa esférica de células cancerosas en un fluido ascítico y debido a las propiedades específicas descritas anteriormente de las células de cáncer de ovario, la muerte de células cancerosas ("apoptosis") no se induce de manera eficaz, incluso cuando las células cancerosas se tratan con un fármaco contra el cáncer típico que tiene efectos sobre otros cánceres. Además, se ha descrito que las células de cáncer de ovario son resistentes a diferentes fármacos contra el cáncer.

Además, el problema, tal como la resistencia a fármacos contra el cáncer, aparece también en cáncer de endometrio, cáncer de mama, etc.

45

Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer, en particular: un fármaco contra el cáncer nuevo que muestre de manera deseable efectos contra el cáncer sobre formas metastásicas específicas de cáncer de ovario, para de este modo, llevar a cabo la apoptosis de células de cáncer de ovario metastásico; un nuevo fármaco contra el cáncer que muestre eficacia excelente sobre cáncer de endometrio, cáncer de mama, etc.; y un nuevo fármaco contra el cáncer que supere la resistencia de las células cancerosas que poseen resistencia hacia los fármacos contra el cáncer convencionales.

La Patente US2013/296362 se refiere a un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece un cáncer con cinasa de FGFR2 (receptor de factor de crecimiento de fibroblastos) amplificada o activada por mutación. Da a conocer BGJ398 solo o como adyuvante auxiliar en combinación con ponatinib para su utilización contra cáncer de endometrio.

La Patente WO2015/191996 da a conocer terapias de combinación que utilizan antagonistas de señalización de FGFR y antagonistas de B-raf. Adicionalmente da a conocer el efecto sinérgico de vemurafenib y BGJ398 sobre tres líneas celulares de cáncer y su aplicabilidad en el tratamiento de cáncer de mama.

La Patente US2016/095842 da a conocer la combinación sinérgica de BGJ398 y un compuesto A (véanse párrafo [0042]) para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de endometrio y cáncer de ovario.

65

Xue B. Holdman et al. "Upregulation of EGFR signaling is correlated with tumor stroma remodeling and tumor recurrence in FGFR-1-driven breast cancer", Breast Cancer Research, volumen 17, número 1, 18 de noviembre de 2015, da a conocer el tratamiento de cáncer de mama con BGJ398 y el efecto beneficioso de su combinación con lapatinib.

5 Konecny G E et al. "Activity of the Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors Dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in Human Endometrial Cancer Cells", Molecular Cancer Therapeutics, Asociación Americana de Investigación de Cáncer, EE. UU., volumen 12, número 5, 1 de mayo de 2014, da a conocer que BGJ398 inhibe de manera significativa el crecimiento in vivo de xenoinjerto de cáncer de endometrio de FGFR2 mutado en modelos de ratones.

10 BYRON S. A. et al. "Fibroblast growth factor receptor inhibition synergizes with Paclitaxel and Doxorubicin in endometrial cancer cells", INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER, volumen 22, no, 9, 1 de noviembre de 2012, da a conocer el efecto sinérgico de paclitaxel o doxorubicina en combinación con inhibidores del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) (tal como PD173074) en el tratamiento de cáncer que
15 eran resistentes a inhibidores de FGFR.

[Divulgación]

[Problema Técnico]

20 Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es dar a conocer una composición farmacéutica novedosa para su utilización tal como se define en las reivindicaciones.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un adyuvante contra el cáncer para su utilización tal como se
25 define en las reivindicaciones.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un complemento para la salud para su utilización tal como se define en las reivindicaciones.

30 [Solución Técnica]

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización de acuerdo con el juego de reivindicaciones adjunto. La presente invención se refiere adicionalmente a un adyuvante contra el cáncer para su
utilización de acuerdo con el juego de reivindicaciones adjunto. La presente invención se refiere incluso además a un
35 complemento para la salud para el uso de acuerdo con el juego de reivindicaciones adjunto.

[Efectos beneficiosos]

La composición farmacéutica de la presente invención puede matar de manera eficaz las células cancerosas
40 presentes en una forma esferoide, de este modo, siendo aplicada de manera útil como un medicamento novedoso para el cáncer de ovario metastásico.

[Descripción de las Figuras]

45 La FIGURA 1 representa diagramas que muestran resultados de observación de forma de células de cáncer de ovario de SKOV3ip1 cultivadas bajo un microscopio después de un cultivo en monocapa 2-dimensional (2D MC) y un cultivo en esfera 3-dimensional (3D SC).

La FIGURA 2 representa diagramas que muestran resultados de identificación de expresión de moléculas de señalización relacionadas con la supervivencia celular en células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas después
50 de un cultivo en monocapa bidimensional (2D MC) y un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 3 representa diagramas que muestran los resultados de identificación de la viabilidad celular cuando las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas se trataron con paclitaxel (PTX), BGJ398, TAE684 e imatinib, respectivamente, a concentraciones diferentes, después de (A) un cultivo en monocapa bidimensional (2D MC) y (B)
un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

55 La FIGURA 4 representa diagramas que muestran los resultados de identificación de la viabilidad celular a través de tinción con violeta cristal cuando las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas se trataron con paclitaxel (PTX), BGJ398, TAE684 e imatinib, respectivamente, a concentraciones diferentes, después de un cultivo en monocapa bidimensional (2D MC) y un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 5 representa diagramas que muestran los resultados de identificación de la forma de células, cuando las
60 células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas se trataron con BGJ398, TAE684 e imatinib, respectivamente, después de un cultivo en monocapa bidimensional (2D MC) y un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 6 representa diagramas que muestran (A) resultados de identificación si existe un cambio en la fosforilación de AKT y STAT3 como moléculas de señalización de supervivencia celular, obtenidos a partir del
tratamiento de células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas con BGJ398; y (B) y (C) resultados de identificación
65 de un cambio en la fosforilación de AKT y STAT3, cuando SKOV3ip1 cultivadas en esferas se trataron con 5 μ M de

BGJ398 (BGJ), 3 μ M de TAE648 (TAE) y 5 μ M de imatinib (IMT), respectivamente, después de un cultivo en monocapa bidimensional (2D MC) y un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 7 representa diagramas que muestran (A) los resultados de identificación de efectos apoptóticos de células, obtenidos a partir del tratamiento de células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas con AG490 a concentraciones diferentes después de un cultivo en monocapa bidimensional (2D MC) y un cultivo en esferas tridimensional (3D SC); y (B) los resultados de identificación de un cambio en grados de fosforilación de AKT y STAT3, cuando las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas se trataron con BGJ398 (BGJ) y AG490 (AG), respectivamente, después de un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 8 representa diagramas que muestran los resultados de identificación de la viabilidad celular, cuando las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas se trataron con paclitaxel (PTX) solo y en combinación con BGJ398, respectivamente, después de un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 9 representa diagramas que muestran los resultados de observación de la forma de células a través de un microscopio, cuando la línea celular de cáncer de endometrio HEC1B se trató con BGJ398, después de un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 10 representa diagramas que muestran los resultados de identificación de efectos apoptóticos de células a través de la tinción con violeta cristal y gráficos, cuando la línea celular de cáncer de endometrio HEC1B se trató con un fármaco contra el cáncer paclitaxel a concentraciones diferentes en combinación con BGJ398.

La FIGURA 11 representa diagramas que muestran los resultados de observación de un cambio en la forma celular a través de un microscopio, cuando la línea celular de cáncer de endometrio HEC1B se trató con un fármaco contra el cáncer paclitaxel a concentraciones diferentes en combinación con BGJ398.

La FIGURA 12 representa diagramas que muestran los resultados de observación de la forma de células a través de un microscopio, cuando la línea celular de cáncer de mama Hs578T se trató con BGJ398 después de un cultivo en esferas tridimensional (3D SC).

La FIGURA 13 representa diagramas que muestran los resultados de identificación de efectos apoptóticos de células a través de la tinción con violeta cristal y gráficos, cuando la línea celular de cáncer de mama Hs578T se trató con un fármaco contra el cáncer paclitaxel a concentraciones diferentes en combinación con BGJ398.

La FIGURA 14 representa diagramas que muestran los resultados de observación de un cambio en la forma celular a través de un microscopio, cuando la línea celular de cáncer de mama Hs578T se trató con un fármaco contra el cáncer paclitaxel a concentraciones diferentes en combinación con BGJ398.

La FIGURA 15 representa la resistencia a paclitaxel ("resistencia a paclitaxel") en SKOV3 y SKOV3-TR, respectivamente.

La FIGURA 16 muestra un cambio en resistencia al fármaco contra el cáncer debido a diferentes enzimas de fosforilación, es decir, BGJ398, TAE648, AG490, en la línea celular de cáncer de ovario resistente a fármaco contra el cáncer paclitaxel SKOV3-TR. De manera particular, las células de cáncer de ovario SKOV3-TR se trataron con paclitaxel (PTX) a concentraciones diferentes, y, a continuación, en combinación con BGJ398, TAE684 y AG490, respectivamente, seguido de la visualización de viabilidad celular a través de la tinción con violeta cristal.

La FIGURA 17 muestra la visualización de efectos inhibitorios de supervivencia celular dependiente de concentración de BGJ398 en relación a paclitaxel a través de la tinción con violeta cristal, seguido de la comparación de los resultados de visualización a través de cuantificación gráfica, cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células SKOV3-TR de la línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel.

La FIGURA 18 muestra una comparación de los resultados de visualización de efectos inhibitorios de supervivencia celular dependiente de concentración de paclitaxel en relación con BGJ398 a través de la tinción con violeta cristal, cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con BGJ398 a las células SKOV3-TR de la línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel durante el cultivo plano 2D y el cultivo en esferas 3D, respectivamente.

La FIGURA 19 muestra la visualización de efectos inhibitorios de supervivencia celular dependiente de concentración de paclitaxel en relación a BGJ398 a través de la tinción con violeta cristal, seguido de la comparación de los resultados de visualización a través de cuantificación gráfica, cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con BGJ398 a las células SKOV3-TR de la línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel.

La FIGURA 20 muestra un cambio en la forma celular debido a la citotoxicidad bajo el análisis de microscopio, cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células SKOV3-TR de la línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel.

La FIGURA 21 muestra un cambio en la forma celular debido a la citotoxicidad bajo el análisis de microscopio cuando se administró solo paclitaxel a concentraciones diferentes o en combinación con BGJ398 a la línea celular resistente a paclitaxel SKOV3ip1-TR que se preparó tratando la línea celular de cáncer de ovario SKOV3ip1 con la concentración gradualmente aumentada de paclitaxel.

La FIGURA 22 muestra los efectos apoptóticos de células derivados de la itotoxicidad detectados mediante la medición del cambio de contenido de ADN a través de FACS, cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células SKOV3-TR de la línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel.

La FIGURA 23 muestra una comparación del grado de apoptosis celular (Sub-G1) mediante resultados que se expresan gráficamente del ensayo FACS aplicado en la FIGURA 21 en un ciclo celular de Sub-G1, G1, S/M y G2.

La FIGURA 24 muestra los resultados de identificación de efectos apoptóticos de células con el tiempo a través de inmunotinción con PARP escindida y actina, cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR.

La FIGURA 25 muestra los efectos apoptóticos de células dependientes de concentración a través de inmunotinción

con PARP escindida y actina, cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR.

La FIGURA 26 muestra los resultados de identificación de la inhibición de fosforilación de AKT y la inducción de escisión de PARP mediante el kit de Matriz de Señalización Intracelular PathScan (Cell Signaling Technology), cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con BGJ398 a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR.

La FIGURA 27 muestra los resultados de identificación de fosforilación de BAD, expresión de XIAP, expresión de CASP9 y fosforilación de p42/44 mediante inmunotinción, que se conocían bien como factores de regulación por disminución para la regulación de apoptosis debido a un cambio en la actividad de AKT dentro de las células, cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con BGJ398 a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR.

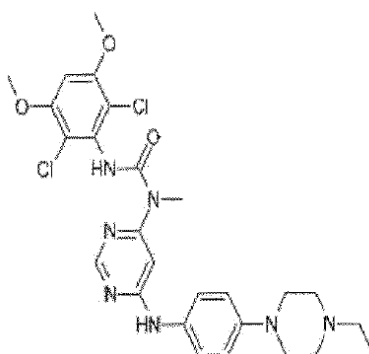
La FIGURA 28 muestra los resultados de identificación de efectos apoptóticos de células de paclitaxel debido a la inhibición de AKT a través de un ensayo de tinción con violeta cristal, cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con Wortmannin (CAS 19545-26-7) como inhibidor selectivo de AKT a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR.

Las FIGURAS 29 a 31 muestran los cambios en SKOV3ip1 y SKOV3-TR debido a la administración de cisplatino solo, BGJ398 solo o en combinación con cisplatino, que se analizaron a través de un ensayo de tinción con violeta cristal.

[Mejor modo]

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico, que incluye un compuesto representado por la Fórmula 1 a continuación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[Fórmula 1]



El compuesto representado por la Fórmula 1 es BGJ398 (Número CAS: 872511-34-7) como un inhibidor de FGFR y se puede dirigir a todos de FGFR 1 a 4. Este compuesto tiene una fórmula química de $C_{26}H_{31}Cl_2H_7O_3$ y un nombre químico de 3-(2,6-dicloro-3,5-dimetoxifenil)-1-[6-[4-(4-etilpiperazin-1-il)anilino]pirimidin-4-il]-1-metilurea.

Con respecto a la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto representado por la Fórmula 1 (a menudo denominado como "compuesto de la Fórmula 1") de acuerdo con la presente invención, los tipos de sal pueden incluir una variedad de sales que poseen eficacia y propiedades biológicas del compuesto sin limitación particular de las mismas. Por ejemplo, las sales de adición farmacéuticamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, sales de ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, tales como sales de acetato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato, carbonato, bisulfato, sulfato, alcanfor sulfonato, cloruro, clorhidrato, cloroteofilina rotato, citrato, etano disulfonato, fumarato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato, hidrógenofosfato, dihidrógenofosfato, propionato, estearato, succinato, salicilato, tartrato, tosilato y trifluoroacetato y similares. Los ácidos inorgánicos, de los que se pueden derivar sales de los mismos, pueden incluir, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ejemplos preferidos de BGJ398 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la presente invención pueden ser sales de ácido fosfórico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el "cáncer de ovario metastásico" hace referencia a cáncer de ovario, en donde las células cancerosas se han propagado a la cavidad abdominal, a diferencia del cáncer de ovario primario derivado de y unido al epitelio de la superficie de ovarios. Las células de cáncer de ovario metastásico en fase terminal se caracterizan por estar presentes en una forma de esfera (esferoide) en fluido ascético.

Con respecto a la definición de las fases del cáncer de ovario en relación al grado de metástasis del cáncer de ovario, el cáncer de ovario que se ha extendido al abdomen se define como "Cáncer de ovario en fase III", en donde el cáncer se ha extendido al hígado, intestino grueso, intestino delgado, vejiga, cavidad abdominal, nódulos linfáticos dentro del peritoneo, etc. "Cáncer de ovario en fase IV" significa que el cáncer ha experimentado metástasis más allá

del abdomen y se ha extendido a otros órganos, tales como pulmón, hueso, cuello, nódulos linfáticos alrededor del cerebro, y se puede denominar metástasis a distancia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el “cáncer de endometrio” significa el cáncer que apareció en el endometrio que cubre el área uterina, y con respecto a la definición de la fase del cáncer de endometrio en relación al grado de metástasis, “cáncer de endometrio en la fase III” se define como un estado que no invadía la vejiga o el recto sin metástasis en la parte exterior de la pelvis, aunque el cáncer se haya extendido a los tejidos alrededor del útero, y significa que el cáncer ha experimentado metástasis en serosa, ovarios, trompas de Falopio, vagina, pared pélvica, nódulos linfáticos aórticos, etc. Paralelamente, “cáncer de endometrio en la fase IV” se define como el cáncer que invadió la vejiga o el recto o experimentó metástasis fuera de la pelvis.

Tal como se utiliza en el presente documento, el “cáncer de mama” significa el cáncer que tuvo lugar en la mama, y con respecto a la definición de la fase del cáncer de mama en relación al grado de metástasis, “cáncer de mama de la fase III” se define como un estado, en el que el cáncer se ha expandido a los nódulos linfáticos en la axila y los nódulos linfáticos se aglomeraron completamente o se fijaron a los tejidos circundantes, o un estado en el que el cáncer se ha extendido a los nódulos linfáticos en la parte superior o la parte inferior de la clavícula. Paralelamente, “cáncer de mama en la fase IV” se define como una condición de metástasis a distancia que el cáncer se ha extendido a otros órganos, tales como el hueso, pulmón, hígado o cerebro.

El compuesto representado por la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la presente invención puede degradar la forma esferoide de células cancerosas.

Tal como se utiliza en el presente documento, la forma esferoide de las células cancerosas significa una masa esférica formada por células cancerosas, es decir, una esfera, que es una estructura para formar agregados tridimensionales. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “esferoide” se puede utilizar de manera intercambiable con una esfera, cuerpo esférico, globoide, etc., de manera adicional, incluye un significado de elipsoides, bolas, etc. sin limitación particular. Los presentes inventores han descubierto que, cuando las células cancerosas se someten a un cultivo 3D para inducir un estado similar a cáncer con metástasis, las células cancerosas conducen a una forma esferoide y se convierten en un estado flotante. A diferencia del tratamiento que utiliza el fármaco contra el cáncer convencional, se descubrió que las células cancerosas que tienen una forma de agregado esferoide no mantienen un estado de agregado normal mediante el tratamiento que utiliza el compuesto de la Fórmula 1, sino que muestran la degradación de la forma esferoide. Por consiguiente, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que posee eficacia terapéutica sobre el cáncer creando una forma esferoide.

El compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede inhibir mantener la forma esferoide en las células de cáncer de ovario cultivadas en 3D que pueden reflejar las células de cáncer de ovario metastásico que implican microambientes en donde las células cancerosas flotan en fluido acético y pueden prevenir una vía de señalización de supervivencia, mostrando de este modo efectos contra el cáncer específicos para el cáncer de ovario metastásico más que para el cáncer de ovario primario adherible típico. Por consiguiente, la composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse para la prevención o el tratamiento, por ejemplo, del cáncer de ovario en fase III o IV.

Además, el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede inhibir la fosforilación de AKT y STAT3, que a su vez pueden prevenir o tratar el cáncer de ovario metastásico que se caracteriza por una fosforilación aumentada del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

Además, de acuerdo con la presente invención, se descubrió que las señales de supervivencia celular más que la proliferación celular, han aumentado en las células de cáncer de ovario metastásico representadas a través del cultivo en esferas 3D. De manera particular, se demostró que las moléculas de señalización de supervivencia celular, es decir, AKT y STAT3 muestran una fosforilación significativamente alta. Además, dicho aumento en la fosforilación no se identifica en las células de cáncer de ovario cultivadas de manera adherente observadas a través de un cultivo único 2D típico, y, por consiguiente, se determinó que los mecanismos de señalización de AKT y STAT3 se utilizan para la supervivencia celular del cáncer de ovario metastásico. Dicha fosforilación aumentada de AKT y STAT3 y fosforilación de FGFR se reducen mediante el tratamiento que utiliza el compuesto de la Fórmula 1, mostrando de este modo los efectos apoptóticos de células sobre las células cancerosas metastásicas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento del cáncer de ovario metastásico, que se caracteriza por que el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden inhibir la fosforilación de AKT y STAT3. De manera particular, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico en donde el cáncer de ovario metastásico muestra fosforilación aumentada del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

De acuerdo con la presente invención, el cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama

pueden ser un cáncer resistente a agentes contra el cáncer químicos (a menudo, “un cáncer quimiorresistente”). Tal resistencia se puede reducir mediante un tratamiento que utiliza el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 El agente contra el cáncer químico puede ser un agente contra el cáncer químico como el que se utiliza ampliamente en la técnica, y puede incluir, por ejemplo, mostaza de nitrógeno, imatinib, oxaliplatino, rituximab, erlotinip, trastuzumab, gefitinib, bortezomib, sunitinib, carboplatino, sorafenip, bevacisumab, cetuximab, viscumalbum, asparaginasa, tretinoína, hidroxycarbamida, dasatinib, estramustina, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab tiuxetan, heptaplatino, ácido metil aminolevulínico, amsacrina, alemtuzumab, procarbazona, alprostadi, nitrato de holmio, quitosano, gemcitabina, doxifluridina, pemetrexed, tegafur, capecitabina, gimeracin, oteracilo, azacitidina, citarabina, fludarabina, enocitabina, decitabina, mercaptopurina, tioguanina, cladribina, carmofur, raltitrexed, docetaxel, paclitaxel, belotecán, topotecán, vinorelbina, etopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, griseofulvina, tenipósido, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona, mitomicina, bleomicina, daunorubicina, dactinomicina, pirarubicina, aclarubicina, pepiomicina, temozolomida, busulfán, ifosfamida, ciclofosfamida, melfalán, altretamina, 15 dacarbazina, tiotepa, nimustina, clorambucilo, mitolactol, taxotere, gleevec, taxol, herceptin, tarceva, avastin, zoladex, adriamicina, irinotecán, 10058-F4, cisplatino, ciclofosfamida, fármacos contra el cáncer a base de nitrosourea, metotrexato, doxorubicina y similares.

De manera particular, el agente contra el cáncer químico puede incluir un agente antimitótico o un agente alquilante.

- 20 El agente antimitótico puede incluir, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, colchicina y griseofulvina. Paralelamente, el agente alquilante puede incluir, por ejemplo, cisplatino. Más particularmente, se puede utilizar paclitaxel.

- Tal como se utiliza en el presente documento, “resistencia” significa que no se expresa ningún nivel eficaz de apoptosis de células cancerosas, tal como se esperaba cuando se trata con el agente contra el cáncer químico. Si como mínimo una parte de las células cancerosas se encuentra en una forma esferoide, las células cancerosas pueden tener mayor resistencia hacia el agente contra el cáncer químico que las células cancerosas adheribles sin la forma esferoide. Tal como se describe anteriormente, el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede degradar la forma esferoide de las células cancerosas, mostrando de este modo la 25 eficacia superior hacia incluso dichos cánceres resistentes a agente contra el cáncer químico tal como se describe anteriormente. Si fuera necesario, se puede administrar la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con los agentes contra el cáncer químicos. Tal como se describe anteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención posee una eficacia excelente hacia incluso los cánceres resistentes a agente contra el cáncer químico, y, por consiguiente, se puede utilizar en combinación con los agentes contra el cáncer 30 químicos, maximizando de este modo la eficacia de los mismos. Los agentes contra el cáncer químicos que se utilizan en combinación con la presente invención pueden ser, por ejemplo, como mínimo, uno entre los agentes contra el cáncer químicos descritos anteriormente.

- Un procedimiento de dicha administración combinada no está particularmente limitado, y la composición de la 40 invención puede administrarse de manera simultánea o secuencial con el agente contra el cáncer químico.

- La composición de la invención puede incluir cualquier portador farmacéuticamente aceptable. Dicho portador aceptable incluido en la composición farmacéutica de la presente invención es cualquiera utilizado de manera habitual durante la preparación y puede incluir, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, 45 almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metil celulosa, metil hidroxibenzoato, propil hidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o un medio, sin limitación a los mismos.

- 50 La composición farmacéutica de la presente invención incluye adicionalmente lubricantes, humectantes, edulcorantes, agentes saborizantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, etc. además de los componentes anteriores.

- La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral, y 55 preferiblemente, se puede administrar por la vía oral.

- Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede variar dependiendo de diferentes factores, tales como un procedimiento de formulación, procedimiento de administración, edad, peso corporal, sexo o condición, alimentación diaria, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción y 60 sensibilidad de respuesta de un paciente, y se puede proporcionar una variedad de prescripciones.

Además, la presente invención se refiere también a un adyuvante contra el cáncer definido en las reivindicaciones adjuntas.

- 65 Tal como se utiliza en el presente documento, el “adyuvante contra el cáncer” hace referencia a una sustancia

utilizada en combinación con el agente contra el cáncer químico para ayudar en/mejorar la eficacia terapéutica del agente contra el cáncer. Tal como se describe anteriormente, el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede bloquear la resistencia/tolerancia de agente contra el cáncer de células cancerosas, y, por consiguiente, puede utilizarse en combinación con un agente contra el cáncer químico para maximizar la eficacia contra el cáncer.

El agente contra el cáncer químico que se utiliza en combinación puede ser, por ejemplo, como mínimo uno entre los agentes contra el cáncer químicos descritos anteriormente. Además, el procedimiento de administración en la administración combinada no está limitado de manera particular. Es decir, el compuesto inventivo puede administrarse de manera simultánea o secuencial con el agente contra el cáncer químico.

Además, la presente invención hace referencia a un complemento para la salud, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el complemento para la salud significa alimento con acción de control biológico, tal como prevención o mejora de enfermedades, biodefensa, inmunización, recuperación de la enfermedad, inhibición de envejecimiento, etc., que debería ser inofensivo para el cuerpo humano cuando se toma durante un largo periodo de tiempo.

El cáncer de ovario metastásico al que se puede aplicar el complemento para la salud de la presente invención puede ser el mismo que se describe anteriormente.

El compuesto representado por la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede formular directamente como un complemento para la salud o se puede añadir a alimentos típicos.

Cuando se añade a los alimentos típicos, el complemento para la salud se puede añadir directamente o se puede utilizar conjuntamente con otros alimentos o ingredientes de alimentos. El complemento de la invención puede utilizarse adecuadamente de cualquier modo convencional. Una cantidad de principio activo para la mezcla se puede determinar de manera adecuada de acuerdo con los fines de uso (prevención, atención médica o tratamiento terapéutico). En general, el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo en alimentos o bebidas de fabricación se añaden en una cantidad del 15 % en peso ("% p") o inferior o, preferiblemente, 10 % en peso o inferior en relación a una materia prima. Sin embargo, en el caso de la ingesta prolongada con fines de salud e higiene o para regular la condición de salud, la cantidad añadida puede ser inferior al intervalo anterior. Además, debido a que no existe ningún problema en el aspecto de seguridad, el principio activo puede utilizarse en una cantidad superior al intervalo anterior.

Los tipos de la alimentación no están limitados de manera particular. Los alimentos a los que se puede añadir el material de la invención pueden incluir, por ejemplo, carnes, salchichas, panes, chocolates, caramelos, refrigerios, galletas, pizza, ramen u otros fideos, chicles, productos lácteos que incluyen helado, diferentes sopas, brebajes, té, bebidas y bebidas alcohólicas y complejos vitamínicos, etc., e incluyen de manera sustancial todos los tipos de alimentos para la salud en la definición general.

La composición para bebidas para la salud de acuerdo con la presente invención puede incluir componentes adicionales, tales como sabores diferentes o carbohidratos naturales, similares a bebidas convencionales. Los carbohidratos naturales descritos anteriormente pueden incluir: monosacárido, tal como glucosa, fructosa, etc.; disacáridos, tales como maltosa, sacarosa, etc.; edulcorantes naturales, tales como dextrina, ciclodextrina, etc.; o edulcorantes sintéticos, tales como sacarina, aspartamo, etc. Un contenido de carbohidratos naturales puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y 10 g, preferiblemente, entre aproximadamente 0,01 y 0,1 g hasta 100 ml de la composición de la invención.

Además, el complemento para la salud de la presente invención puede incluir adicionalmente diferentes nutrientes, vitaminas, electrolitos, agentes saborizantes, agentes colorantes, ácido péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácido orgánico, espesantes coloidales de protección, agentes modificadores de pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcohol y agentes gasificantes utilizados en refrescos.

Además, el complemento para la salud de la presente invención puede contener adicionalmente pulpa de fruta para la producción de zumos naturales de frutas, bebidas de zumos de frutas y bebidas vegetales. Los componentes anteriores pueden utilizarse de manera independiente o en combinación con dos o más de los mismos. El contenido del aditivo descrito anteriormente no es crítico, pero se puede seleccionar de manera general en un intervalo de entre 0,01 y 0,1 partes en peso basándose en 100 partes en peso del complemento para la salud de la presente invención.

Además, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de tratamiento de cáncer de ovarios metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama, que incluye la administración del compuesto representado por la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la presente invención a un sujeto.

El sujeto hace referencia un paciente que necesita tratamiento contra el cáncer y, preferiblemente, incluye mamíferos que incluyen el ser humano. El paciente puede incluir todos los pacientes sometidos al tratamiento contra el cáncer, los pacientes que han recibido el tratamiento contra el cáncer y los pacientes que necesitan el tratamiento contra el cáncer, y puede incluir adicionalmente a los pacientes que han recibido un procedimiento quirúrgico para eliminar (extraer) el cáncer con el fin de tratar el cáncer.

El cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama al que se puede aplicar el procedimiento de tratamiento divulgado puede ser el mismo que se describe anteriormente.

El procedimiento de tratamiento tal como se da a conocer en el presente documento puede incluir la administración del compuesto representado por la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente contra el cáncer químico.

El cáncer al que se aplica el procedimiento de tratamiento divulgado puede incluir cánceres resistentes a agentes contra el cáncer químicos (a menudo denominado "un cáncer quimiorresistente"). Antes de decidir la administración conjunta del agente contra el cáncer químico, se debería determinar si el cáncer en el sujeto es un cáncer quimiorresistente o no. A continuación, si el cáncer se identifica como cáncer quimiorresistente, el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse en combinación con el agente contra el cáncer químico, sin estar particularmente al mismo.

El agente contra el cáncer químico que se puede utilizar en combinación puede ser, por ejemplo, como mínimo, uno entre los agentes contra el cáncer químicos descritos anteriormente. Además, el procedimiento de administración en administración combinada no está particularmente limitado, y el compuesto de la invención o sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden administrarse de manera simultánea o secuencial con el agente contra el cáncer químico.

El compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse como una composición, que incluye el principio activo conjuntamente con otros componentes, tal como se han descrito anteriormente, que se puede administrar por vía oral o parenteral, y, preferiblemente, puede administrarse por vía oral.

Una dosis adecuada puede prescribirse de forma distinta basándose en diferentes factores, tales como un procedimiento de formulación farmacéutica, procedimiento de administración, edad, peso corporal, sexo o condición, alimentación diaria, tiempo de administración, vía de administración, tasa de excreción, sensibilidad a la respuesta de un paciente o similares.

Además, la presente divulgación se refiere al uso del compuesto representado por la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama.

El cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama en el uso de la presente divulgación puede ser el mismo que se ha descrito anteriormente.

Tal como se ha descrito anteriormente, el compuesto de la Fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede mostrar una eficacia terapéutica superior hacia el cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama, siendo utilizado de este modo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

El medicamento, tal como se da a conocer en el presente documento, puede incluir la composición farmacéutica descrita anteriormente.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con detalle a modo de ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proponen solamente con fines de ilustración de la presente invención y no pretenden limitar el contenido de la presente invención.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante tres (3) experimentos independientes. Las diferencias entre los grupos individuales se evaluaron mediante una prueba t de Student, en donde $p \leq 0,05$ se considera significativo. Todos los gráficos se expresan como promedio y desviación estándar.

Ejemplo 1. Comparación de células de cáncer de ovario SKOV3ip1 en un modelo de cultivo monocapa 2D y un modelo de cultivo en esferas 3D

1.1 El procedimiento de cultivo monocapa 2D y cultivo en esferas 3D

Se utilizó la línea celular SKOV3ip1, que incluye la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 como metrocito, como la línea celular de cáncer de ovario. La línea celular SKOV3 posee características de cáncer de ovario metastásico aislado de fluido ascítico en un ovario y es una línea celular separada después de la proliferación primaria en la cavidad abdominal de un ratón desnudo utilizado como modelo de animal que posee una capacidad de metástasis abdominal muy alta. La línea celular SKOV3ip1 fue ofrecida por el Profesor Sood AK (Universidad de Texas MD Anderson Cancer Center, EE. UU.) y, a continuación, se utilizó en experimentos.

El cultivo en monocapa 2D se realizó de la siguiente manera: las células se cultivaron a 37 °C, atmósfera humedecida con 5% de CO utilizando un medio RPMI 1640 (Corning, NY, EE. UU.) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Gibco, NY, EE. UU.) y 10 U/ml de penicilina/estreptomicina.

Para el cultivo en esferas 3D, las células SKOV3ip1 (1×10^6) se dispensaron sobre una placa de 6 pocillos con adherencia ultra baja (Corning NY, EE. UU.), y a continuación, se cultivaron en una incubadora con 5 % de CO₂ utilizando un medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Gibco, NY, EE.UU.) y 10 U/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco).

1.2 Análisis morfológico de acuerdo con el procedimiento de cultivo

Las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 se dividieron y se cultivaron mediante cultivos en monocapa 2D (2D MC) y cultivos en esferas 3D (3D SC), respectivamente. Para observar si están presentes diferentes formas de acuerdo con los procedimientos de cultivo, se realizó un análisis microscópico y los resultados del mismo se muestra en la FIGURA 1 a continuación.

Tal como se muestra en la FIGURA 1, no se formó ningún agregado en el cultivo en monocapa 2D. Sin embargo, 72 horas después del cultivo en esferas 3D, las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 han formado agregados en forma de láminas sueltas, las cuales a su vez se acumularon en una forma esferoide densa. A partir de tales resultados, se demostró que el cultivo en monocapa 2D y el cultivo en esferas 3D pueden inducir diferentes formas de células, y, en particular, el cultivo en esferas 3D puede reflejar un cáncer de ovario de tipo metastásico que está presente en un estado flotante en fluido ascítico en la cavidad abdominal más que en un estado adherido.

1.3 Análisis del cambio de señal de supervivencia celular de acuerdo con el procedimiento de cultivo

Para identificar si aparece o no un cambio en las vías de señalización asociado a la supervivencia celular de acuerdo con el cultivo en monocapa 2D (2D MC) y cultivo en esferas 3D (3D SC), se llevó a cabo una inmunotinción. Más particularmente, después de cultivar las células SKOV3ip1 (1×10^6) mediante el cultivo en monocapa 2D o cultivo en esferas 3D descritos en el apartado 1.1, se detectó la expresión de moléculas de señalización de células que incluyen AKT, STAT3, p42/44 ERK y p38 MAPK y se compararon los estados de activación en las células cultivadas en monocapa y las células cultivadas en esferas. Las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa y cultivadas en esferas se recogieron y se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato 1X enfriada en hielo, seguido de la disolución de las mismas en 100 µl de tampón RIPA enfriado en hielo (Tris-Cl 20 mM, pH 8,0, NaCl 125 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM, Triton X-100 al 1 %, deoxicolato de sodio al 0,5 %, dodecilsulfato de sodio al 0,1 %, 1X de cóctel completo de inhibidores de proteasa (Roche, Mannheim, Alemania)) sobre hielo. Después de la evaluación de la concentración de proteínas utilizando un kit de ensayo de proteínas Bradford (Biorad, CA, EE. UU.), la misma cantidad de proteínas (30 µg) se separó mediante SDS-PAGE y se trasladó a una membrana de nitrocelulosa, seguido de la inmunotinción de la misma utilizando un peróxido de rábano picante conjugado con un segundo anticuerpo y un anticuerpo específico. Se detectó una banda de activación inmune con Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo, IL, EE. UU.) utilizando un analizador de quimioluminiscencia Fusion Solo (Vilber Lourmat Marne la Vallée, Francia). Los anticuerpos para STAT3 (H-190), STAT3 (B-7) fosforilada en Tyr705 y actina (C-2) se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos monoclonales de conejo en AKT, AKT (D9E) fosforilada en Ser473, FGFR1 fosforilado en Tyr 653/654, p42/44 MAPK, p42/44 MAPK fosforilada, p38 MAPK y p38 MAPK fosforilada en Tyr 180/182 se adquirieron en Cell Signaling Technology (MA, EE. UU.). Además, los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón y conejo conjugados con HRP se adquirieron en Jackson Laboratories, mientras que BGJ398 utilizado en el experimento (frente a FGFR1/2/3) se adquirió en Selleckchem (EE. UU.).

La expresión de moléculas de señalización celular implicadas en la proliferación celular, que incluyen AKT, STAT3, p42/44 ERK y p38 MAPK, se identificó, y los resultados de comparación de los estados de activación entre las células cultivadas en monocapa y las células cultivadas en esferas se muestran en la FIGURA 2.

Tal como se muestra en la FIGURA 2, como un resultado de la inmunotinción, se determinó que la fosforilación de p42/44 ERK, AKT y STAT3 se activó en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas más que en las células SKOV3ip1 cultivadas en un cultivo en monocapa 2D. Además, se observó que FGFR1 fosforilados tenían regulación por incremento en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas. Dichos resultados demostraron que las condiciones de cultivo en esferas pueden llevar a una regulación por incremento de una vía de señalización de prosupervivencia en las células SKOV3ip1, y, además, indicó que un ambiente de proliferación esférica para reflejar microambientes

con metástasis de la línea celular de cáncer de ovario utiliza un mecanismo de señalización de AKT y STAT3 para retener la viabilidad celular de la línea celular SKOV3ip1.

La regulación por incremento de la vía de señalización de supervivencia celular en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas 3D puede reflejar el cáncer de ovario en un estado metastásico, que existe en un estado de supervivencia más que un estado de proliferación, y es un resultado coincidente con las características morfológicas identificadas en el Ejemplo 1.2 mencionado anteriormente.

Ejemplo 2. Reducción de la viabilidad celular de células SKOV3ip1 cultivadas en esferas mediante BGJ398

Para identificar si BGJ398 como un inhibidor de todos los FGFR selectivo puede ejercer influencia sobre las células SKOV3ip1, células SKOV3ip1 cultivadas en diferentes ambientes de cultivo se trataron utilizando BGJ398, seguido de la evaluación de la viabilidad celular. Además, los inhibidores de tirosina cinasa, tales como TAE684 (NVP-TAE684, CAS 761439-42-3) e imatinib, también conocido como gleevec, así como el agente quimioterapéutico contra el cáncer de ovario estándar, es decir, paclitaxel, se utilizaron para comparar la actividad antitumoral en las células SKOV3ip1. TAE684 (frente a ALK) e imatinib (frente a Abl) utilizados en los experimentos se adquirieron en Selleckchem (EE. UU.), mientras que AG490 (frente a JAK, CAS 133550-30-8) se adquirió en Tocris (Bristol, RU).

La tinción con violeta cristal se implementó para determinar la viabilidad celular en el modelo de células cultivadas en monocapa y el modelo de células cultivadas en esferas. Para llevar a cabo la tinción con violeta cristal en el modelo de cultivo en monocapa, las células SKOV3ip1 (5×10^4) se dispensaron en placas comerciales de 24 pocillos y se incubaron durante la noche. A partir de entonces, el fármaco se dispensó a una concentración deseada para el experimento en cada pocillo, seguido de la incubación adicional durante 72 horas. Se añadieron 300 μ l de solución de violeta cristal al 0,2 % a cada pocillo, seguido de la incubación adicional durante 20 minutos con agitación suave de la misma. Las células teñidas se lavaron con agua destilada hasta que se observó el fondo claro. Para la evaluación utilizando un colorímetro, se extrajo el colorante de violeta cristal con SDS/PBS al 1 % y se midió la absorción a una longitud de onda de 570 nm mediante el lector de microplacas EMax PLUS (Molecular Device, EE.UU.).

Para evaluar la viabilidad celular en las células cultivadas en esferas, se dispensaron células SKOV3ip1 (5×10^4) sobre la placa de 24 pocillos con adherencia muy baja y se cultivaron durante la noche. Las células se recogieron de cada pocillo y se movió la placa comercial de 24 pocillos, seguido de la incubación adicional durante 12 horas. Las células adheridas y visualizadas se tiñeron con la solución de violeta cristal al 0,2 % durante 20 minutos mientras se agitaba de manera suave. Las células teñidas se lavaron con agua destilada hasta que se observó un fondo claro. Para la evaluación utilizando un colorímetro, se extrajo el colorante de violeta cristal con SDS/PBS al 1 % y se midió la absorción a una longitud de onda de 570 nm mediante el lector de microplacas EMax PLUS (Molecular Device, EE.UU.).

Las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa o cultivadas en esferas se trataron con el inhibidor de tirosina cinasa y paclitaxel durante 72 horas, se determinó la viabilidad celular mediante el colorímetro de violeta cristal y los resultados de la misma se muestran en la FIGURA 3.

Tal como se muestra en la FIGURA 3, la viabilidad celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa fue reducida por paclitaxel y TAE648 de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, la viabilidad celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa no se vio afectada por BGJ398 e imatinib. Especialmente, se observó que las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas eran obviamente más resistentes a paclitaxel que las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa, mientras que la resistencia a TAE648 no se identificó en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas. Además, imatinib tampoco afectó la viabilidad celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas. Paralelamente, BGJ398 mostró diferentes efectos sobre la viabilidad celular de las células SKOV3ip1 dependiendo del cultivo en monocapa o el cultivo en esferas. Más particularmente, BGJ398 reveló efectos apoptóticos de células específicos para las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas a una temperatura muy baja y redujo la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis.

Adicionalmente, después del tratamiento utilizando paclitaxel u otros inhibidores diferentes, los resultados de visualización de la viabilidad celular de 72 horas a través de la tinción con violeta cristal se muestran en la FIGURA 4, y tales resultados de observación de las células teñidas con violeta cristal, tal como se muestran en la FIGURA 4, también corroboraron el resultado del análisis colorimétrico.

Cuando las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa se trataron utilizando BGJ398, no se reveló citotoxicidad ni siquiera con la concentración aumentada del mismo hasta 5 μ M. Sin embargo, las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas tridimensionales mostraron citotoxicidad durante el Día 3 incluso cuando las células se trataron solo con 1 μ M de BGJ398, y se demostró un aumento dependiente de la dosis. Es decir, BGJ398 no mostró actividad contra el cáncer en las células de cáncer de ovario cultivadas en monocapa 2D que reflejaban el cáncer adherible, mientras mostraba una actividad contra el cáncer alta específica de las células de cáncer de ovario cultivadas en esferas 3D, es decir, células de cáncer de ovario metastásico.

Además, la FIGURA 5 muestra los resultados de identificación de la forma agregada de las células SKOV3ip1 de acuerdo con los tratamientos con cultivo en monocapa (2D MC), cultivo en esferas 3D (3D SC), y 5 μ M de BGJ398 (BGJ), 3 μ M de TAE648 (TAE) y 5 μ M de imatinib (IMT).

5

Tal como se muestra en la FIGURA 5, las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas tratadas con BGJ398 no mantuvieron un estado normal de coagulación. Por el contrario, no se observó degradación esferoide en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas con el tratamiento con imatinib y TAE684. Estos resultados indicaron que BGJ398 puede ser un agente terapéutico químico contra el cáncer para las células SKOV3ip1 de cáncer de ovario metastásico formando un esferoide, y también demostraron que esto puede inducir la citotoxicidad específica en cultivo en esferas que refleja microambientes metastásicos para el cáncer de ovario.

10

Ejemplo 3. Identificación de efecto inhibidor de fosforilación de AKT y STAT3 de BGJ398

15 BGJ398 demostró tener una actividad contra el cáncer específicamente excelente en el cultivo en esferas como microambiente metastásico en el Ejemplo 2. Debido a este fundamento, para determinar qué tipos de mecanismos de señalización celular se utilizan para inducir la citotoxicidad específica mediante BGJ398 en el ambiente de cultivo en esferas, se examinaron la expresión y la actividad de diferentes factores involucrados en la supervivencia y la proliferación celular a través de transferencia western.

20

En las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas, el Ejemplo 1 demostró que se activaban las moléculas de señalización de supervivencia celular, es decir, AKT y STAT3. Debido a este fundamento, para determinar si BGJ398 puede variar el estado de AKT y STAT3 en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas, las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa (MC) o cultivadas en esferas (SC) SKOV3ip1 se sometieron a un tratamiento utilizando 5 μ M de BGJ398, seguido del análisis del grado de fosforilación debido al tratamiento anterior.

25

Además, las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas se trataron con 5 μ M de BGJ398 (BGJ), 3 μ M de TAE648 (TAE) y 5 μ M de imatinib (IMT), respectivamente. Después de 72 horas, se obtuvo un lisado celular y se sometió a inmunotinción, seguido del análisis de la expresión celular activa de AKT y STAT3 con el anticuerpo para el mismo.

30

Además, se utilizó un nivel de fosforilación de FGFR1 como un grupo de control positivo en relación a los grupos de tratamiento con BGJ, mientras que se utilizó actina como un grupo de control de carga. Los resultados del análisis se muestran en la FIGURA 6. El procedimiento de ensayo con inmunotinción se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

35

Tal como se muestra en la FIGURA 6, los resultados del ensayo de inmunotinción demuestran que BGJ398 inhibe la AKT fosforilada en el residuo Ser473 en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas (A). Paralelamente, TAE684 e imatinib no mostraron tales efectos como los descritos anteriormente (B). Estos resultados indican que BGJ398 inhibe de manera específica la vía de señalización de AKT y STAT3 que se activó en las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas más que en las células cultivadas en monocapa. Es decir, cuando las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas se trataron utilizando BGJ398, se determinó que la fosforilación de AKT y STAT3 activada durante el cultivo en esferas se suprime de nuevo. Este resultado indica que la fosforilación de AKT y STAT3 activada en el entorno metastásico de cáncer de ovario se suprime de nuevo a través de la inhibición del mecanismo de señalización de FGFR mediante BGJ398. En un caso de SKOV3ip1 cultivadas en monocapa bidimensional, no se observó un aumento en la fosforilación de AKT y STAT3 y tampoco se manifestó una reducción en la fosforilación y la citotoxicidad mediante BGJ398.

45

Dado que la supervivencia celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas se inhibe mediante el tratamiento con BGJ398, se examinó adicionalmente si dicha inhibición de supervivencia celular está intermediada a través de la vía de señalización JAK/STAT3. Con este fin, se utilizó el inhibidor selectivo de tirosina cinasa JAK AG490 a concentraciones diferentes de 3,125 a 50 μ M para tratar las células SKOV3ip1 cultivadas en monocapa o cultivadas en esferas, y después de 72 horas se examinó si esto afecta a la viabilidad celular y la activación de AKT y STAT3 a través de la tinción con violeta cristal y un ensayo con inmunotinción, y los resultados de los mismos se muestran en la FIGURA 7. La actina se utilizó como un grupo de control de carga.

50

55 Tal como se muestra en la FIGURA 7, el tratamiento con AG490 no suprimió el crecimiento celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas (A). Además, la fosforilación de AKT y STAT3 tampoco fue inhibida mediante el tratamiento con AG490 sobre las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas (B). Tales resultados indican que BGJ398 puede suprimir de manera eficaz el crecimiento celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas a través de la inhibición de las moléculas principales de señalización de supervivencia, es decir, AKT y STAT3, independientemente de la vía de señalización de JAK/STAT3.

60

Ejemplo 4. Identificación de la eficacia de BGJ398 sobre las líneas celulares cancerosas

Con respecto a las líneas celulares de cáncer enumeradas en la Tabla 1 a continuación, los efectos sinérgicos de paclitaxel y BGJ398 se examinaron con más detalle. De acuerdo con los mismos procedimientos que se describen

65

en los ejemplos anteriores, cada línea celular se dividió y se cultivó mediante el cultivo en monocapa 2D y el cultivo en esferas 3D, respectivamente. A continuación, se analizó un cambio debido a la administración de BGJ398 a través del análisis morfológico y el ensayo de tinción con violeta cristal. Todas las líneas celulares se adquirieron en ATCC y se utilizaron en los presentes experimentos, y la información detallada de los mismos se muestra en la

5 Tabla 3 a continuación.

[TABLA 1]

Línea celular	Origen
HEC1B	Endometrio
Hs578T	Mama

10 Los resultados de la línea celular HEC1B de cáncer de endometrio se muestran en las FIGURAS 9, 10 y 11, mientras que los resultados de la línea celular Hs578T de cáncer de ovario se muestran en las FIGURAS 12, 13 y 14.

En referencia a las FIGURAS 9 hasta 12, después de la administración de BGJ398, la apoptosis celular puede encontrarse en la línea celular de cáncer de endometrio y la línea celular de cáncer de mama cultivadas en esferas, similar a la línea celular SKOV (cáncer de ovario).

Ejemplo 5. Identificación del efecto sinérgico de paclitaxel y BGJ398 sobre cada línea celular de cáncer

20 5.1 SKOV3ip1

Se demostró que BGJ398 podía actuar como un fármaco contra el cáncer eficaz para las células de cáncer de ovario cultivadas en esferas tridimensionales. Bajo este fundamento, cuando se administró BGJ398 en combinación con paclitaxel utilizado típicamente como el fármaco contra el cáncer principal existente para el cáncer de ovario, se determinó si se supera y se mejora la resistencia a paclitaxel de las células cultivadas en esferas. Es decir, para determinar si una combinación de BGJ398 y paclitaxel muestra efectos sinérgicos en la apoptosis celular de las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas, las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas se trataron utilizando una combinación de paclitaxel y BGJ398 diluidos de manera continua en diferentes dosis de 0, 1,25 y 5 μ M, respectivamente. A continuación, después de 72 horas, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico con violeta cristal y los resultados del mismo se muestran en la FIGURA 8.

Tal como se muestra en la FIGURA 8, se observó que las células SKOV3ip1 cultivadas en esferas tratadas utilizando paclitaxel en combinación con BGJ398 tenían una apoptosis celular más alta que las células tratadas solo con paclitaxel. Más particularmente, después de la comparación de los dos grupos experimentales, en donde uno es las células SKOV3ip1 cultivadas 3D tratadas con paclitaxel solo a concentraciones diferentes ("grupo no tratado con BGJ398"), y el otro es las células tratadas con 1,25 y 5 μ M de BGJ398, respectivamente ("grupo tratado con BGJ398"), se confirmó que el grupo tratado con BGJ398 ha aumentado la sensibilidad a paclitaxel de una manera dependiente de la dosis, en comparación con el grupo no tratado con BGJ398. Bajo este fundamento, se identificó que, cuando se administra BGJ398 en combinación con paclitaxel, las células de cáncer de ovario SKOV3ip1 cultivadas en esferas podían eliminarse de manera eficiente. Esto indica que la inhibición de la actividad del factor de crecimiento de fibroblastos utilizando BGJ398 puede ser altamente eficaz en la supresión de la proliferación del cáncer de ovario metastásico durante el cultivo en esferas tridimensional que es el microambiente metastásico del cáncer de ovario. En otras palabras, BGJ398 puede mostrar capacidad anticáncer eficaz en las células de cáncer de ovario cultivadas en esferas que puede reflejar un estado de cáncer de ovario metastásico.

45 5.2 Otras líneas celulares

Con respecto a las líneas celulares de cáncer enumeradas en la Tabla 2 a continuación, los efectos sinérgicos de paclitaxel y BGJ398 se examinaron con más detalle. De acuerdo con los mismos procedimientos que se describen en los ejemplos anteriores, cada línea celular se dividió y se cultivó mediante el cultivo en monocapa 2D y el cultivo en esferas 3D, respectivamente. A continuación, se analizó un cambio debido a la administración de BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a través del análisis morfológico. En el cultivo en esferas 3D tanto de la línea celular de cáncer de endometrio HEC1B como de la línea celular de cáncer de mama Hs578T, se observó citotoxicidad, en donde las esferas celulares se colapsan para provocar la unificación de las células. Tal como se muestra en la FIGURAS 10 y 13, en el cultivo en monocapa 2D tanto de la línea celular de cáncer de endometrio HEC1B como de la línea celular de cáncer de mama Hs578T, se determinó que la administración de BGJ398 en combinación con paclitaxel permite a BGJ398 potenciar los efectos contra el cáncer de paclitaxel.

[TABLA 2]

Línea celular	Origen
HEC1B	Endometrio
Hs578T	Mama

Los resultados de HEC1B se muestran en las FIGURAS 9, 10 y 11, mientras que los resultados de Hs578T se muestran en las FIGURAS 12, 13 y 14.

5 En referencia a las FIGURAS 9 a 13, después de la administración de BGJ398 solo, la apoptosis celular puede encontrarse en la línea celular de cáncer de endometrio y la línea celular de cáncer de mama cultivados en esferas, como la línea celular (cáncer de ovario) SKOV. Además, tal como se muestra en las FIGURAS 10 y 11, así como en las FIGURAS 13 y 14, después de la administración de BGJ398 en combinación con paclitaxel, se puede encontrar que la apoptosis celular aumenta adicionalmente.

10

Teniendo en consideración todos estos resultados, se entiende que: BGJ398 como un inhibidor de todos los FGFR puede ser un agente terapéutico altamente eficaz para cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio, cáncer de mama, etc.; y para dirigir que ese FGFR pueda servir de manera específica para promover la supervivencia manteniendo la forma esferoide de las células de cáncer de ovario, BGJ398 puede acelerar la degradación del esferoide en el cáncer de ovario metastásico, logrando de este modo la apoptosis celular del cáncer de ovario metastásico.

15

Ejemplo 6. Identificación de los efectos sinérgicos de paclitaxel y BGJ398 sobre SKOV3/SKOV3-TR

20 6.1 Comparación de la resistencia a paclitaxel de SKOV3/SKOV3-TR

SKOV3-TR (resistente a Taxol) incluye la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 como metrocito y es una línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel que se preparó mediante la incubación a largo plazo utilizando paclitaxel con la concentración aumentada de manera gradual. La línea celular SKOV3-TR fue proporcionada por Sood AK en MD - Anderson Cancer Center (EE. UU.) y a continuación se utilizó en los experimentos presentes.

25

La resistencia a paclitaxel de cada una de SKOV3 y SKOV3-TR se determinó mediante la medición de la viabilidad celular a través de un ensayo colorimétrico con violeta cristal. Este experimento se llevó a cabo tres veces y se estimó una diferencia en los resultados de los mismos mediante la prueba t de Student.

30

En lo que se refiere a la FIGURA 15, se pudo observar que la resistencia a paclitaxel de la línea celular SKOV3-TR es significativamente más alta que la línea celular SKOV.

35 6.2 Efectos de promoción de la capacidad anticáncer de paclitaxel mediante BGJ398 en la línea celular resistente a paclitaxel SKOV3-TR

De acuerdo con los mismos procedimientos descritos en los ejemplos anteriores, cada línea celular se dividió y se cultivó mediante el cultivo en monocapa 2D y el cultivo en esferas 3D, respectivamente. A continuación, se analizó un cambio debido a la administración de BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a través del análisis morfológico y el ensayo de tinción con violeta cristal.

40

La FIGURA 16 muestra la visualización de la viabilidad celular, que es el resultado del tratamiento de células de cáncer de ovario SKOV3-TR con paclitaxel (PTX) solo o en combinación con BGJ398, TAE684 y AG490, respectivamente. En referencia a esta figura, se puede observar que la actividad contra el cáncer mejora de manera significativa mediante BGJ398 en combinación con paclitaxel, en comparación con el tratamiento que utiliza paclitaxel solo.

45

La FIGURA 17 muestra la viabilidad celular, que es el resultado de la administración de paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células de cáncer de ovario después de la incubación de la línea celular resistente a paclitaxel SKOV3-TR mediante el cultivo en monocapa 2D y el cultivo en esferas 3D, respectivamente. En referencia a esta figura, se puede observar que la actividad contra el cáncer mejora más mediante la administración de BGJ398 en combinación con paclitaxel en ambos procedimientos de cultivo anteriores.

50

La FIGURA 18 muestra un resultado de determinación si BGJ398 posee efectos contra el cáncer dependientes de concentración sobre las células de cáncer de ovario SKOV3-TR conjuntamente con el uso de paclitaxel. En particular, esta figura muestra la viabilidad celular que es el resultado de la administración de paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel. En referencia a esta figura, se puede observar que la actividad contra el cáncer es insignificante mediante la administración de paclitaxel solo, mientras que la administración de BGJ398 en combinación con paclitaxel tiene resistencia bloqueada, alcanzando de este modo una actividad contra el cáncer más alta con la concentración aumentada de BGJ398.

55

60

La FIGURA 19 muestra un resultado de determinación si paclitaxel posee efectos contra el cáncer dependientes de concentración sobre las células de cáncer de ovario SKOV3-TR conjuntamente con el uso de BGJ398. En particular, esta figura muestra la viabilidad celular que es el resultado de la administración de paclitaxel solo, BGJ398 solo o en

combinación con paclitaxel. En referencia a esta figura, se puede observar que la actividad contra el cáncer es insignificante mediante la administración de paclitaxel solo, mientras que la administración de BGJ398 en combinación con paclitaxel tiene resistencia bloqueada, alcanzando de este modo una actividad contra el cáncer más alta con la concentración aumentada de paclitaxel.

5

La FIGURA 20 muestra un cambio en la forma celular debido a la citotoxicidad bajo el análisis de microscopio, cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR. Para las células SKOV3-TR, se puede observar que tanto el tratamiento utilizando 2,5 μ M de BGJ398 como el tratamiento que utiliza 50 nM de paclitaxel muestran citotoxicidad insignificante y no muestra ningún cambio morfológico, mientras que el tratamiento que utiliza una combinación de estos dos fármacos revela un fenómeno de desprendimiento debido a la citotoxicidad y la formación de células con formas irregulares.

10

En la FIGURA 21, la línea celular de cáncer de ovario resistente a paclitaxel utilizada en el presente documento se preparó a partir de la línea celular de SKOV3ip1 con las concentraciones aumentadas de manera gradual de paclitaxel en el laboratorio presente. La FIGURA 21 muestra un cambio en la forma celular cuando se administró paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con BGJ398 a las células de cáncer de ovario SKOV3ip1-TR. Esta figura muestra que dicha combinación, tal como se describe anteriormente, puede bloquear la resistencia a paclitaxel, aumentando de este modo la actividad contra el cáncer.

15

La FIGURA 22 muestra un grado de citotoxicidad debido a la administración de paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR, que se demostró mediante el ensayo FACS. Más particularmente, el grado de la apoptosis celular puede confirmarse cuando el contenido de ADN en la célula se trata mediante la tinción con yoduro de propidio (PI) y se evalúa mediante FACS. Si la apoptosis celular tiene lugar, los genes en las células se alteran y se aumenta la región Sub-G1 por debajo de G1. Con este fundamento, se puede observar que la región por debajo de G1 se aumenta drásticamente y el número de las células apoptóticas se aumenta mediante el tratamiento que utiliza BGJ398 en combinación con paclitaxel (aumento en Sub-G1).

20

25

La FIGURA 23 muestra de manera gráfica los resultados de FACS, que se dividieron por un ciclo celular en los mismos experimentos descritos anteriormente. En lo que se refiere a esta figura, se puede observar que el tratamiento que utiliza 2,5 μ M de BGJ398 en combinación con 50 nM de paclitaxel aumenta las células Gub-G1 en las células SKOV-TR en aproximadamente 2,5 veces, en comparación con 50 nM de paclitaxel solo, mejorando de este modo la actividad contra el cáncer.

30

Las FIGURAS 24 y 25 muestran la expresión de PARP escindida y actina después de la administración de paclitaxel solo, BGJ398 solo o en combinación con paclitaxel a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR, que se determinó mediante el procedimiento de inmunotinción descrito anteriormente. En referencia a estas figuras, se puede observar que la expresión de PARP escindida y actina se aumenta de una manera dependiente de concentración y el tiempo mediante el tratamiento que utiliza BGJ398 en combinación con paclitaxel.

35

40

La FIGURA 26 muestra los resultados de identificación de inhibición de fosforilación de AKT e inducción de escisión de PARP mediante el kit de Matriz de Señalización Intracelular PathScan (Cell Signaling Technology), cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con BGJ398 a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR. A partir de la figura, se puede observar que, después de la administración de BGJ398 en combinación con paclitaxel, la fosforilación de AKT en serina 473 se reduce mientras la PARP escindida aumenta.

45

La FIGURA 27 muestra los resultados de identificación si hay expresión de AKT, AKT fosforilada, BAD, BAD fosforilada, XIAP, CASP9, p42/44 y/o p42/44 fosforilada, para determinar el mecanismo "down-signal" de AKT en relación a la supervivencia celular y la apoptosis celular en las células cuando se administró paclitaxel solo o en combinación con BGJ398 a las células de cáncer de ovario SKOV3-TR. En referencia a esta figura, se puede observar que un nivel de AKT fosforilada en las células SKOV3-TR disminuye de manera significativa mediante el tratamiento con BGJ398 y, especialmente, se reduce la expresión de XIAP. Se considera que la razón de este hecho se debe a que disminuye el nivel de expresión de XIAP en las células, mejorando de este modo la sensibilidad a paclitaxel.

50

55

La FIGURA 28 muestra un resultado de determinación si los efectos contra el cáncer de paclitaxel mejoran más o menos de una manera dependiente de concentración en las células SKOV3-TR mediante el tratamiento de células SKOV3-TR con wortmannin conocido como un inhibidor de PI3K/AKT a concentraciones diferentes. Este resultado indica que el mecanismo de señalización de AKT es un factor regulador muy importante para superar la resistencia al fármaco contra el cáncer paclitaxel en las células SKOV3-TR.

60

Ejemplo 7. Identificación de los efectos sinérgicos de cisplatino y BGJ398 sobre SKOV3ip1/SKOV3-TR

De acuerdo con los mismos procedimientos tal como se han descrito en los ejemplos anteriores, cada línea celular se sometió a un cultivo 2D y se analizó un cambio de las mismas después de la administración de cisplatino solo,

65

BGJ398 solo o en combinación con cisplatino a través del ensayo de tinción con violeta cristal.

Con referencia a la FIGURA 29, se puede observar que tanto SKOV3ip1 como SKOV3-TR muestran sensibilidad a cisplatino. Además, en lo que se refiere a las FIGURAS 30 y 31, se puede observar que la actividad contra el cáncer se mejora mediante la administración de BGJ398 en combinación con cisplatino.

Las líneas celulares utilizadas en los experimentos anteriores se enumeran en la Tabla 3 a continuación.

[TABLA 3]

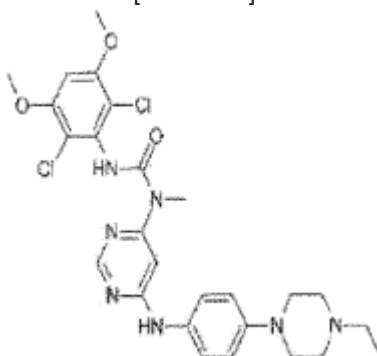
10

Línea celular	Origen	Descripción
OSE (células epiteliales de la superficie ovárica)	Células epiteliales de ovario normales	Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
SKOV3	Adenocarcinoma epitelial de ovario	Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
SKOV3ip1	SKOV3	- Obtenidas a partir de SKOV3 - Obtenidas a partir de fluido ascético de ratones desnudos 7 semanas después de la inyección peritoneal de SKOV3 - Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
A2780	Adenocarcinoma epitelial de ovario	Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
Hey AB	Carcinoma epitelial de ovario	Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
Hey AB-MIR	Carcinoma epitelial de ovario	- Obtenidas a partir de Hey AB - Obtenidas tras exposición continua de Hey AB a paclitaxel - Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
SKOV3-TR	SKOV3	- Obtenidas a partir de SKOV3 - Obtenidas tras exposición continua de SKOV3 a paclitaxel - Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)
SKOV3ip1-TR	SKOV3ip1	- Obtenidas a partir de SKOV3ip1 - Obtenidas tras exposición continua de SKOV3ip1 a paclitaxel - Proporcionadas por MD Anderson Cancer Center (Sood A)

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica para su utilización en la prevención o el tratamiento de cáncer de ovario metastásico, que comprende un compuesto representado por la Fórmula 1 a continuación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula 1]



10

2. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, en la que el cáncer de ovario metastásico incluye células cancerosas, una parte de las cuales se encuentra en forma esferoide.

3. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, en la que el cáncer de ovario metastásico es cáncer de ovario en fase III o fase IV.

4. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica se administra en combinación con un agente contra el cáncer químico.

5. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 4, en la que el agente contra el cáncer químico es un agente antimitótico o un agente alquilante.

6. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 4, en la que el agente contra el cáncer químico incluye paclitaxel.

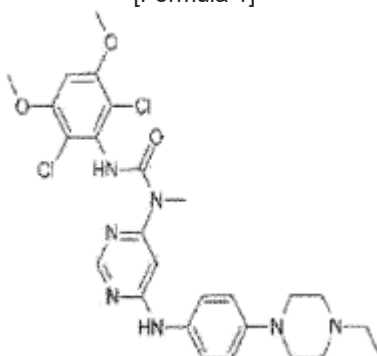
25

7. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende además un agente contra el cáncer químico, en la que el agente contra el cáncer químico es un agente antimitótico o un agente alquilante.

8. Composición farmacéutica para su utilización, según la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende además paclitaxel.

9. Adyuvante contra el cáncer para su utilización en ayudar en la eficacia terapéutica de un agente contra el cáncer para un cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama, que comprende un compuesto representado por la fórmula 1 a continuación o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista alimentario, en el que el cáncer de ovario metastásico, cáncer de endometrio o cáncer de mama es un cáncer resistente a paclitaxel:

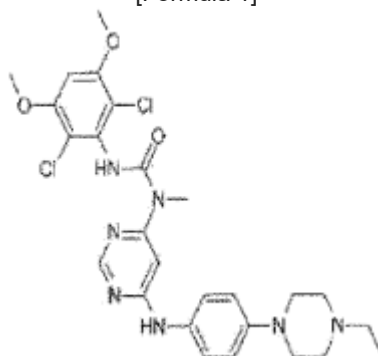
[Fórmula 1]



10. Adyuvante contra el cáncer para su utilización, según la reivindicación 9, en el que el adyuvante contra el cáncer se administra en combinación con paclitaxel.

- 5 11. Complemento funcional para la salud para su utilización para la prevención o mejora del cáncer de ovario metastásico, que comprende un compuesto representado por la fórmula 1 a continuación o una sal del mismo aceptable desde el punto de vista alimentario:

[Fórmula 1]



10

12. Complemento funcional para la salud para su utilización, según la reivindicación 11, en el que el cáncer de ovario metastásico incluye células cancerosas, una parte de las cuales se encuentra en forma esferoide.

13. Complemento funcional para la salud para su utilización, según la reivindicación 11, en el que el cáncer de ovario metastásico es cáncer de ovario en fase III o fase IV.

15

Fig. 1

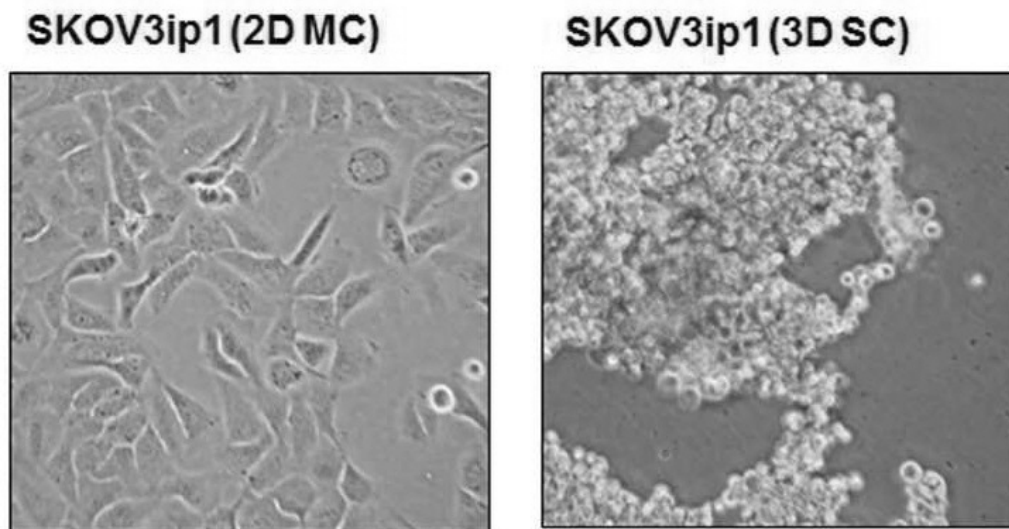


Fig. 2

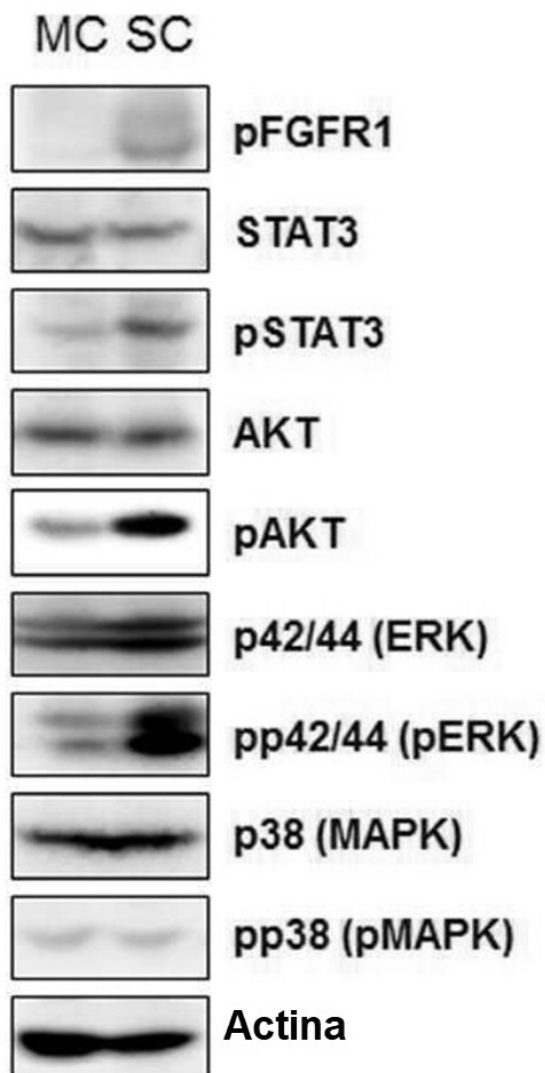
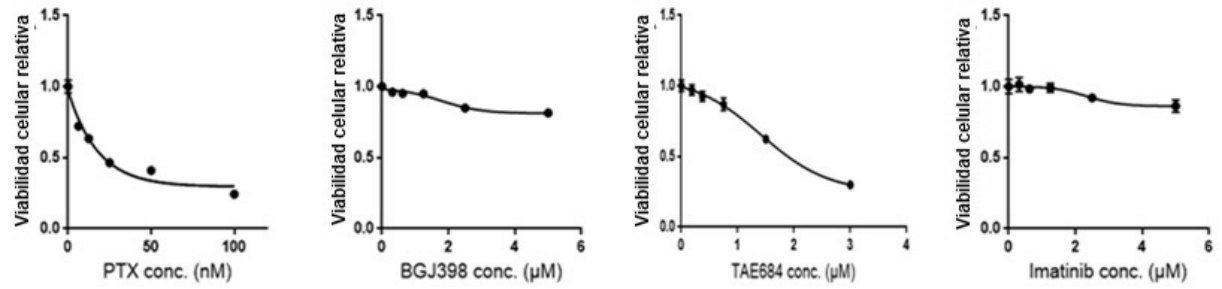


Fig. 3

A SKOV3ip1 (2DMC)



B SKOV3ip1 (3D SC)

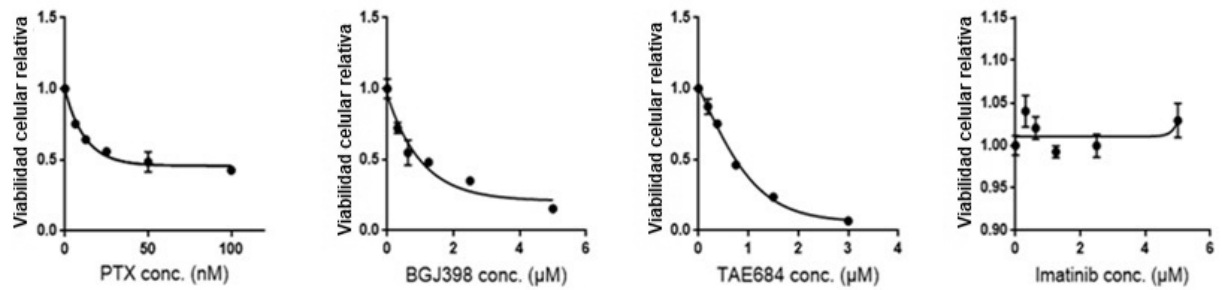


Fig. 4

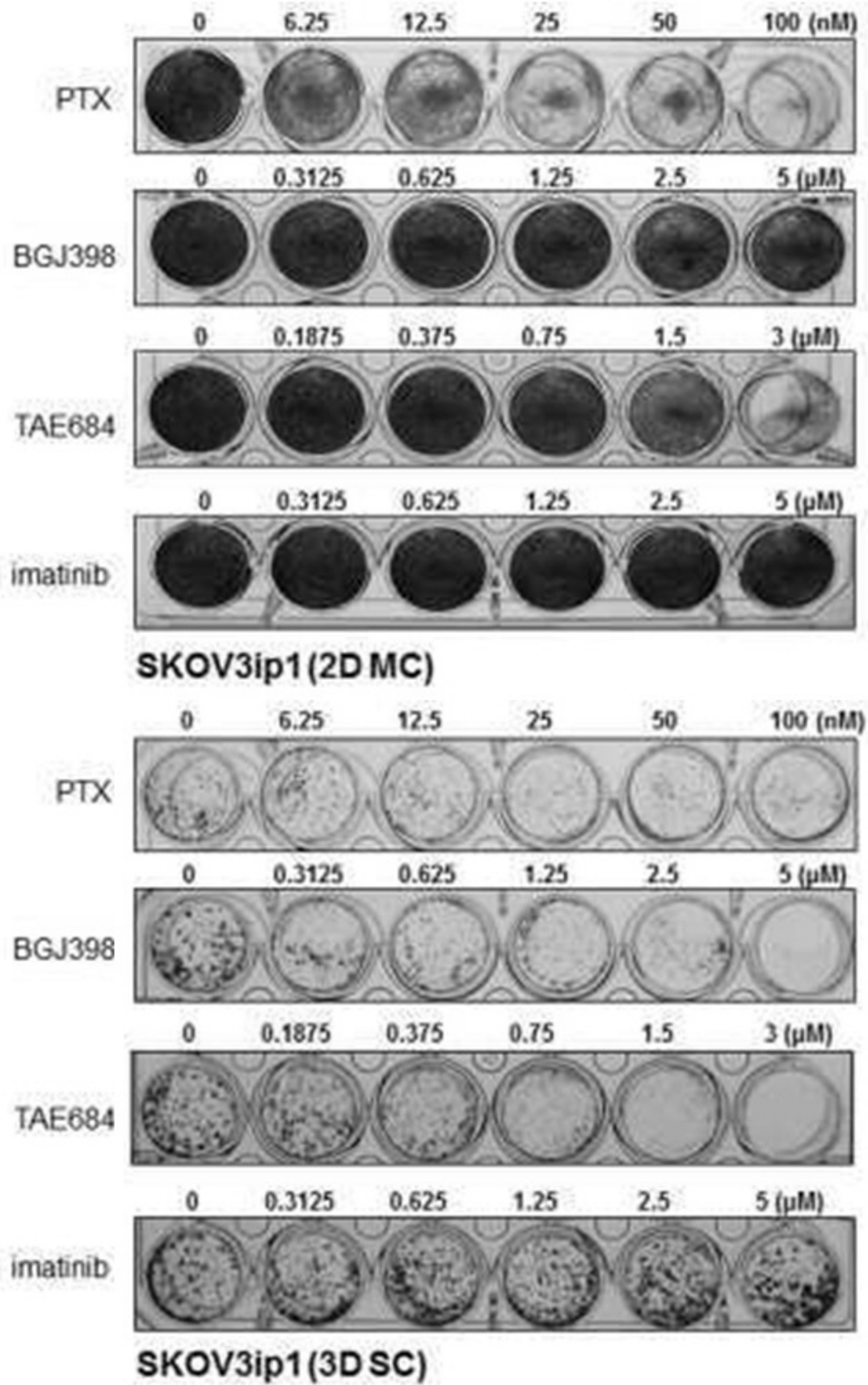


Fig. 5

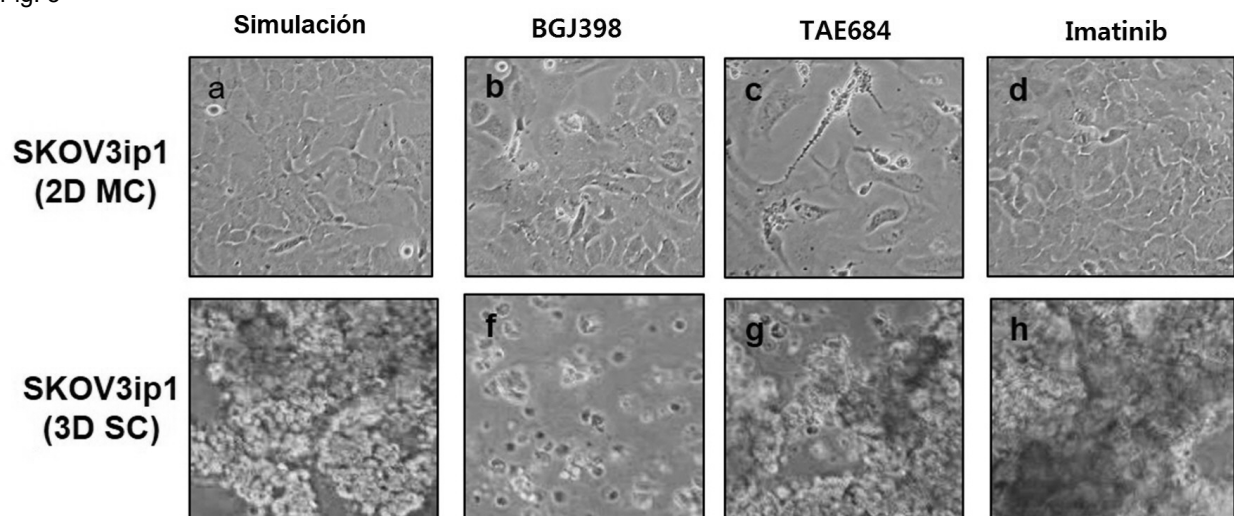


Fig. 6

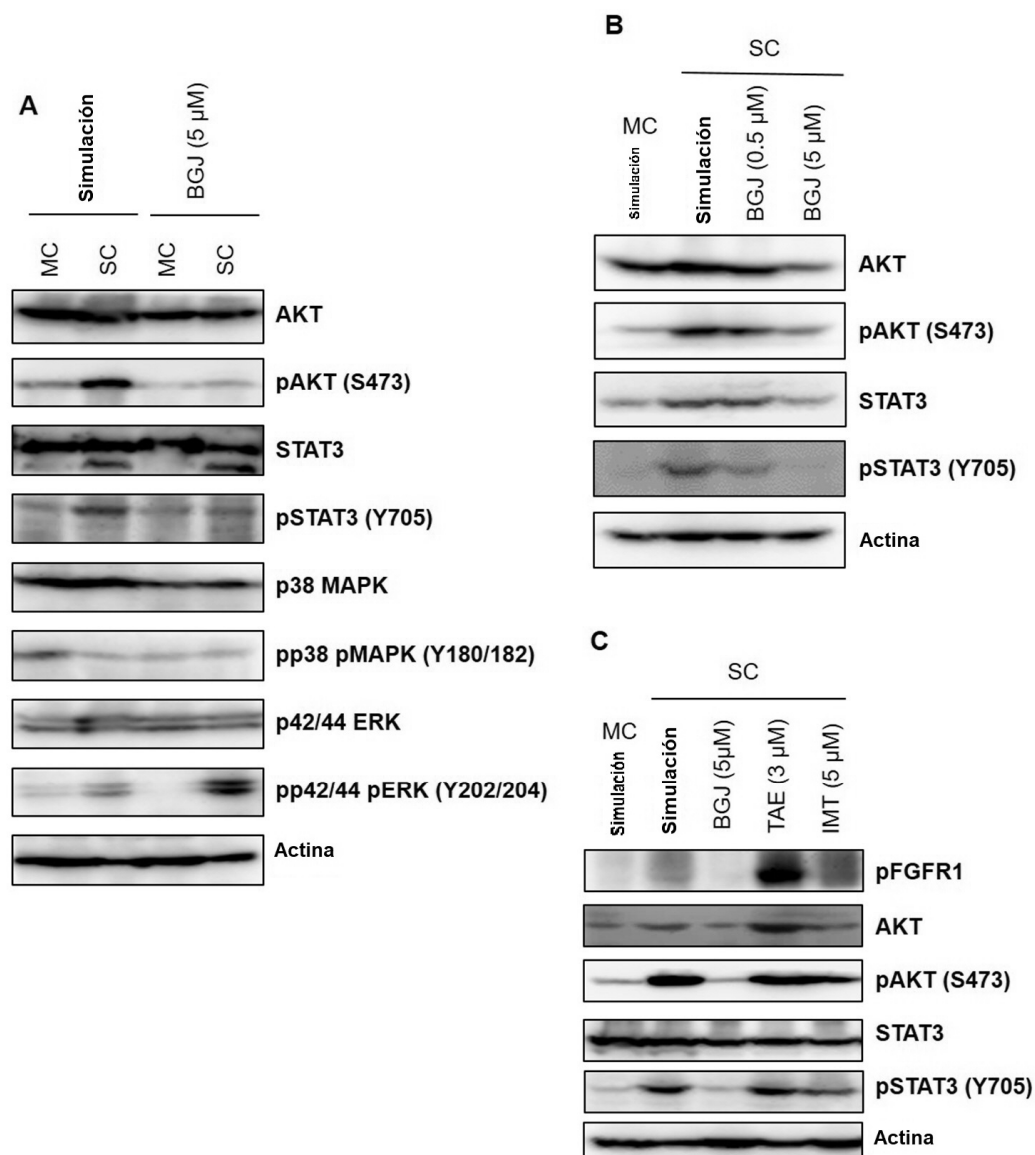


Fig. 7

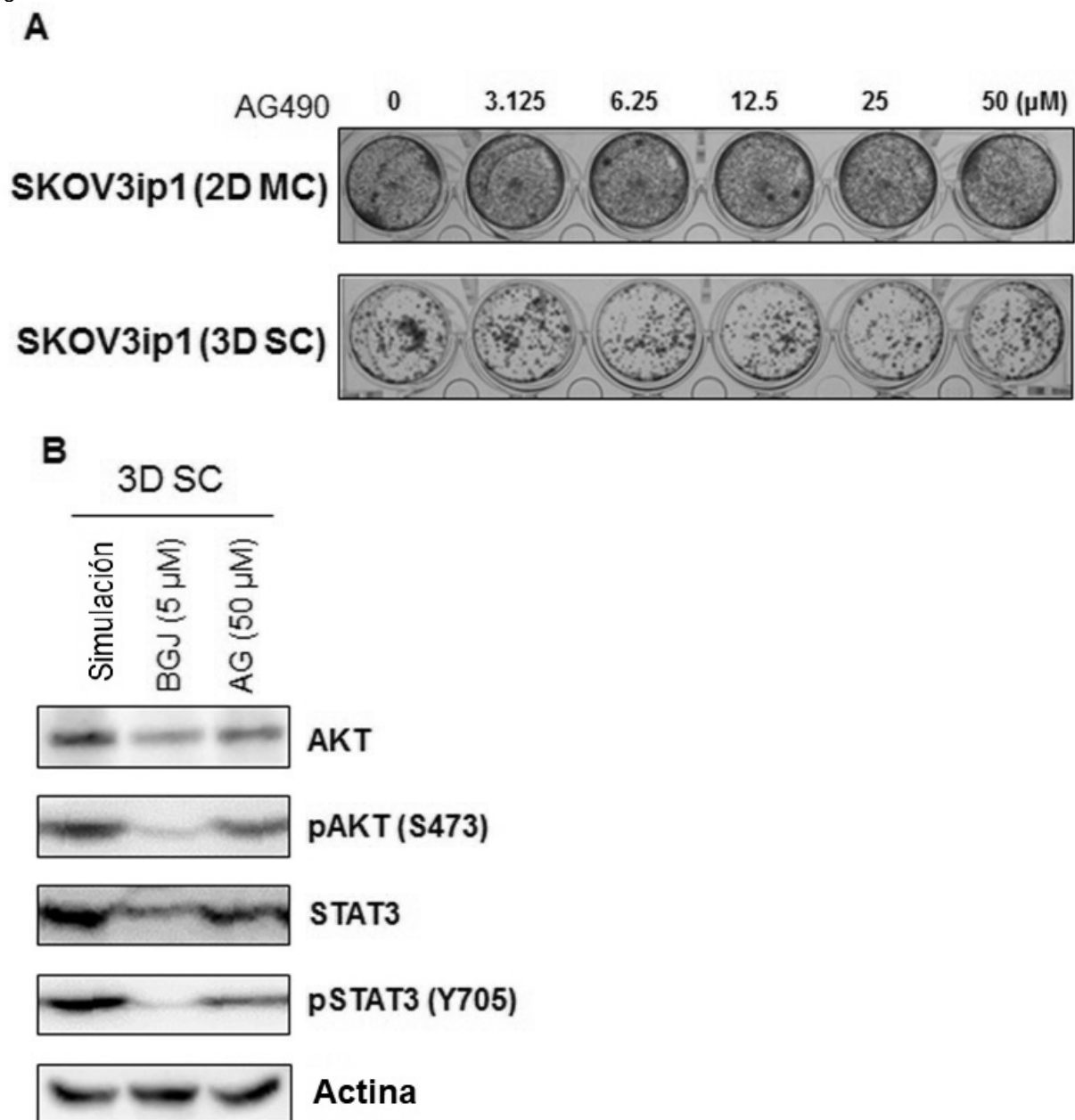


Fig. 8

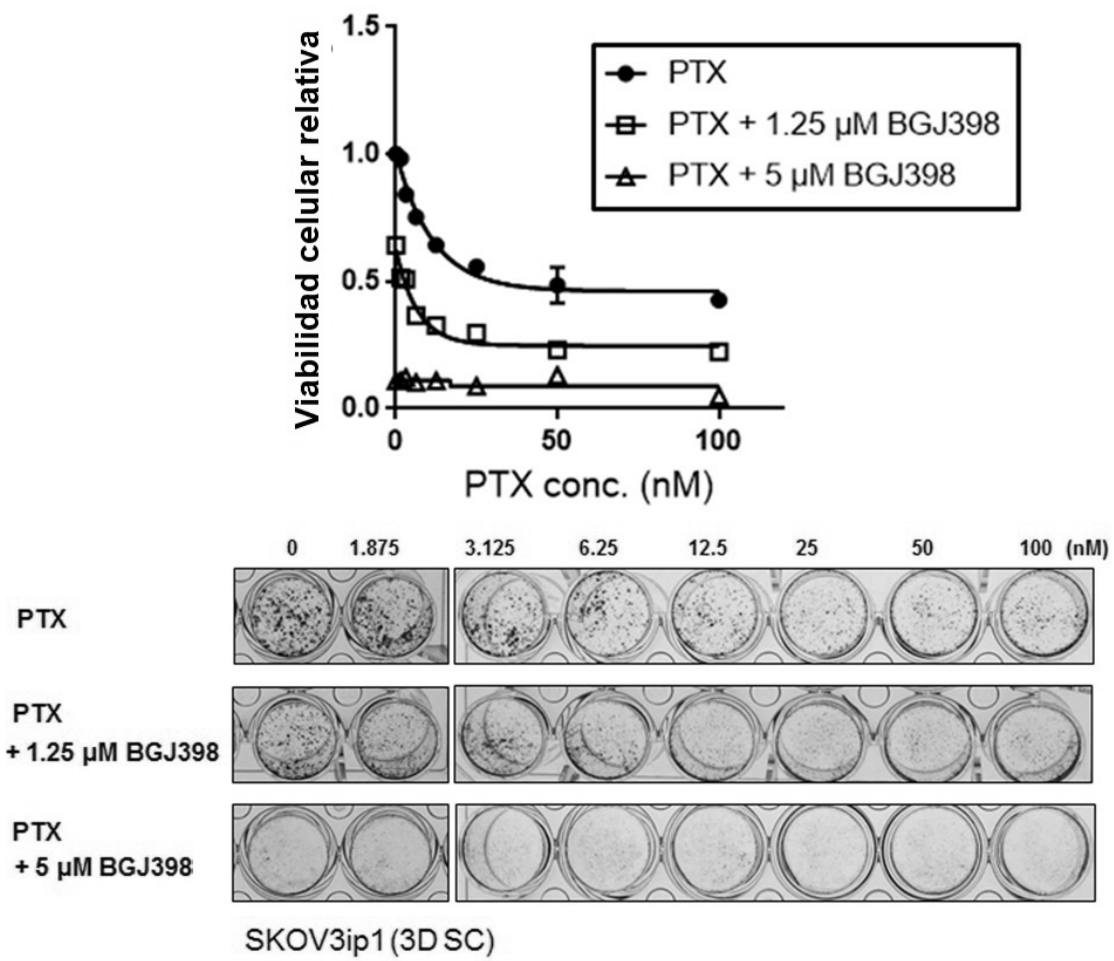
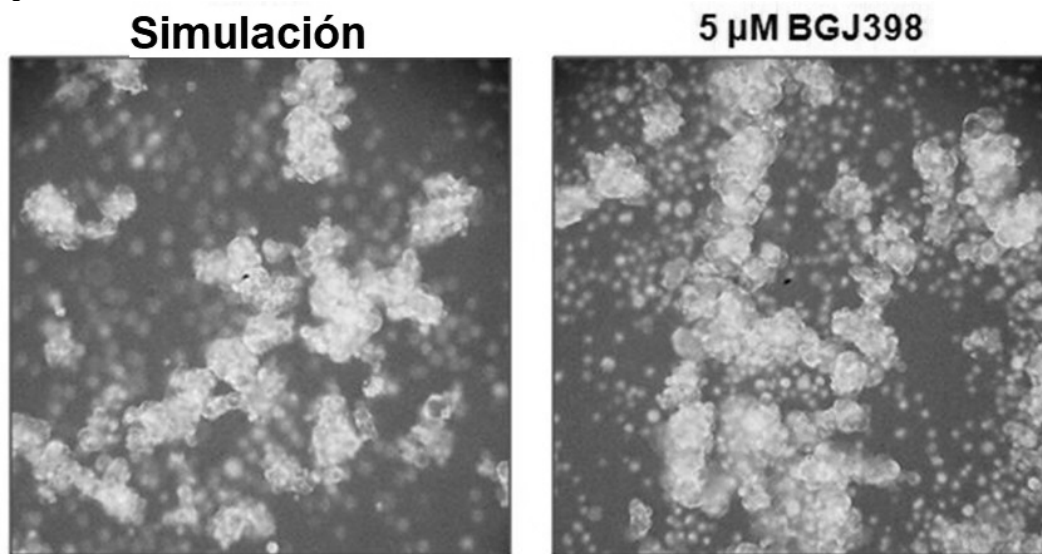
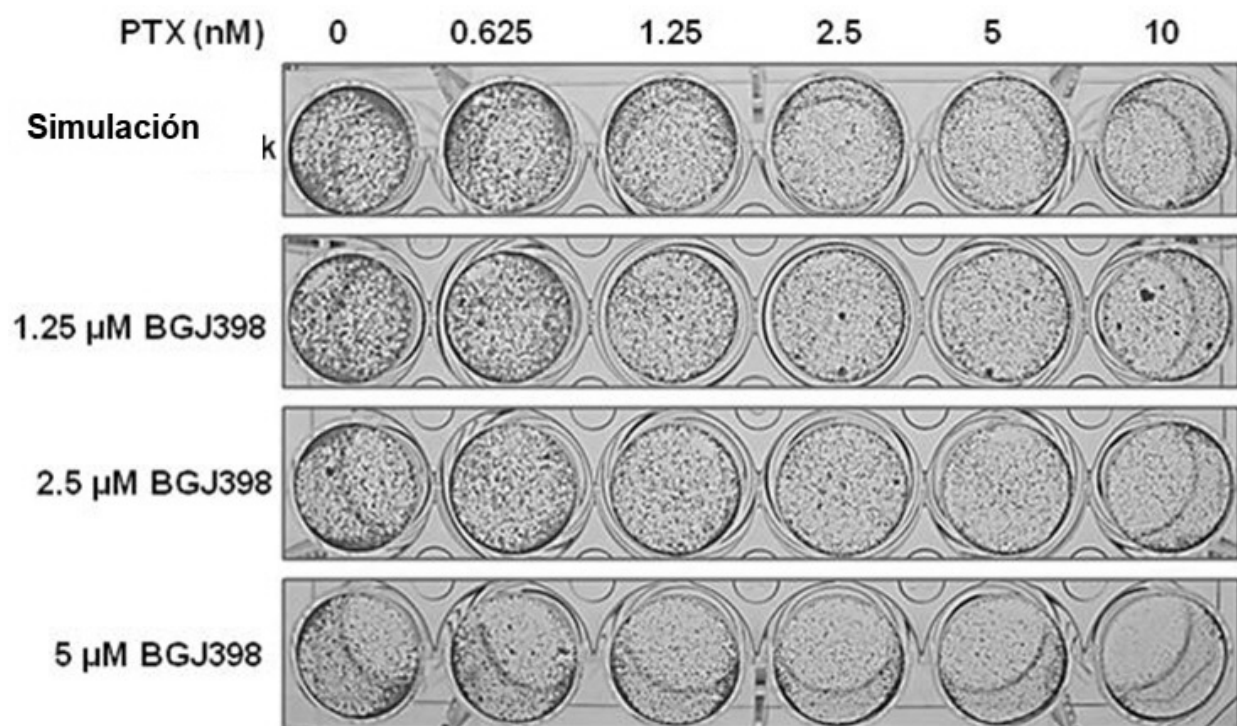


Fig. 9



línea celular de cáncer de endometrio HEC1B (cultivo de esferas)

Fig. 10



línea celular de cáncer de endometrio HEC1B

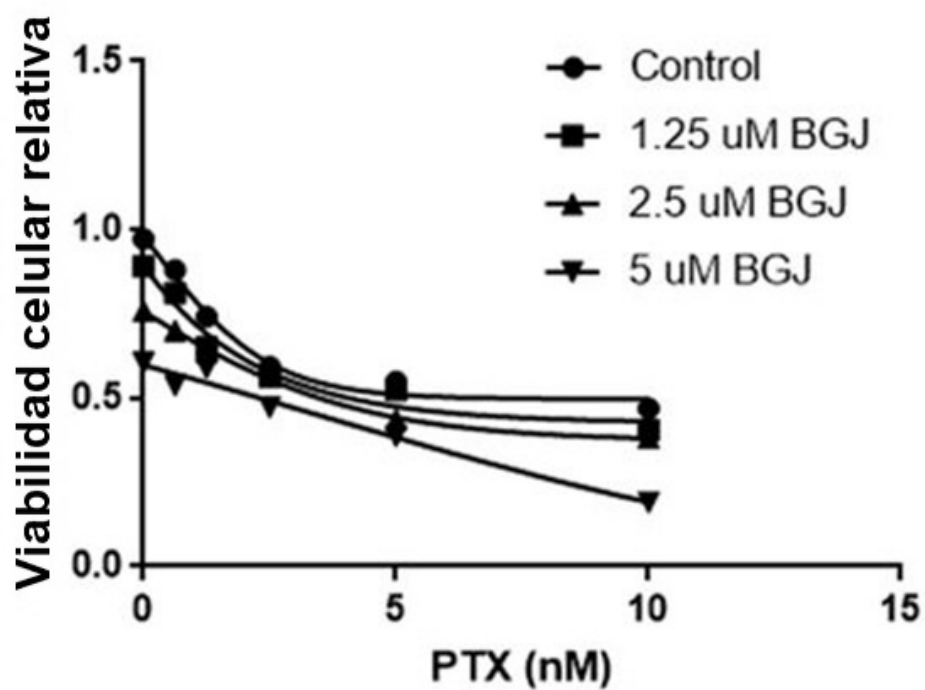


Fig. 11

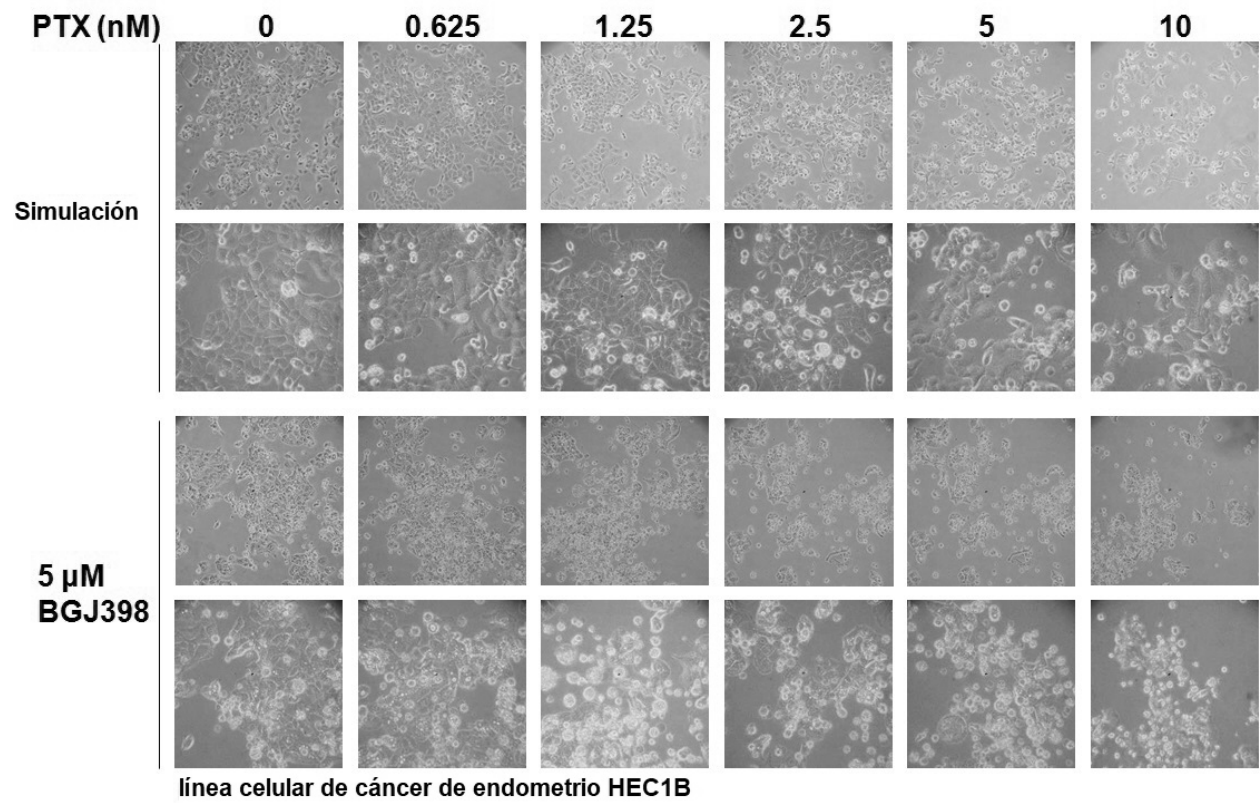


Fig. 12

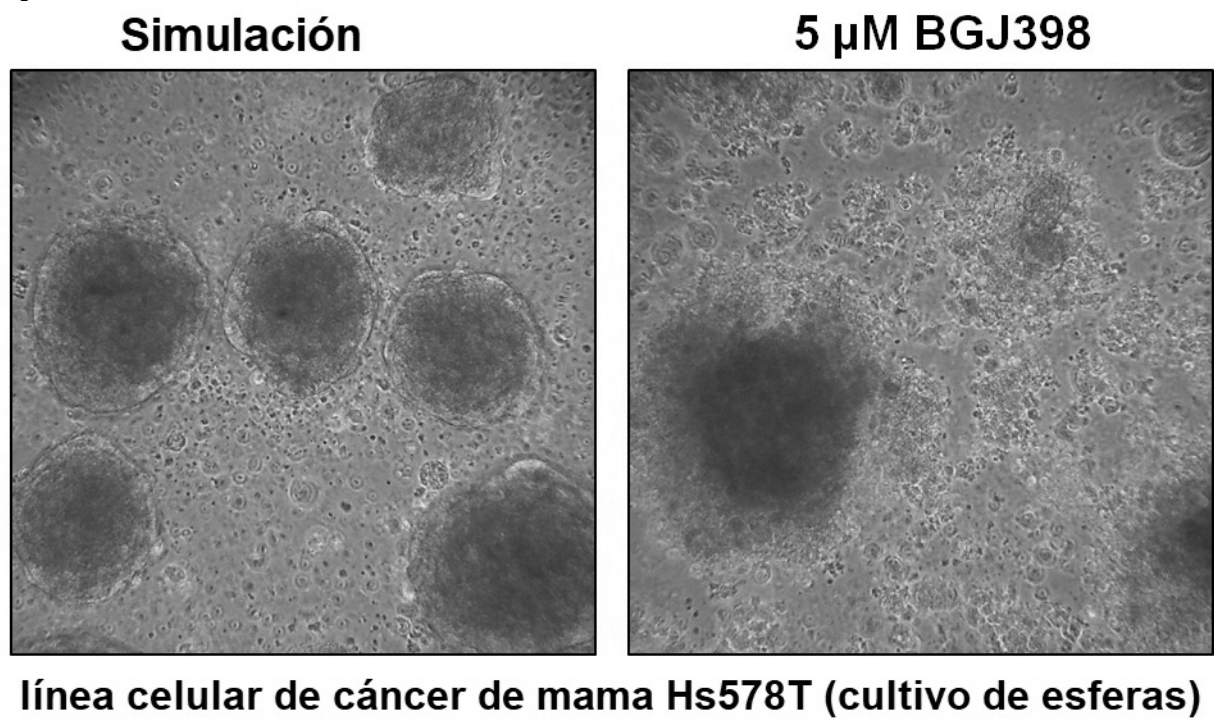


Fig. 13

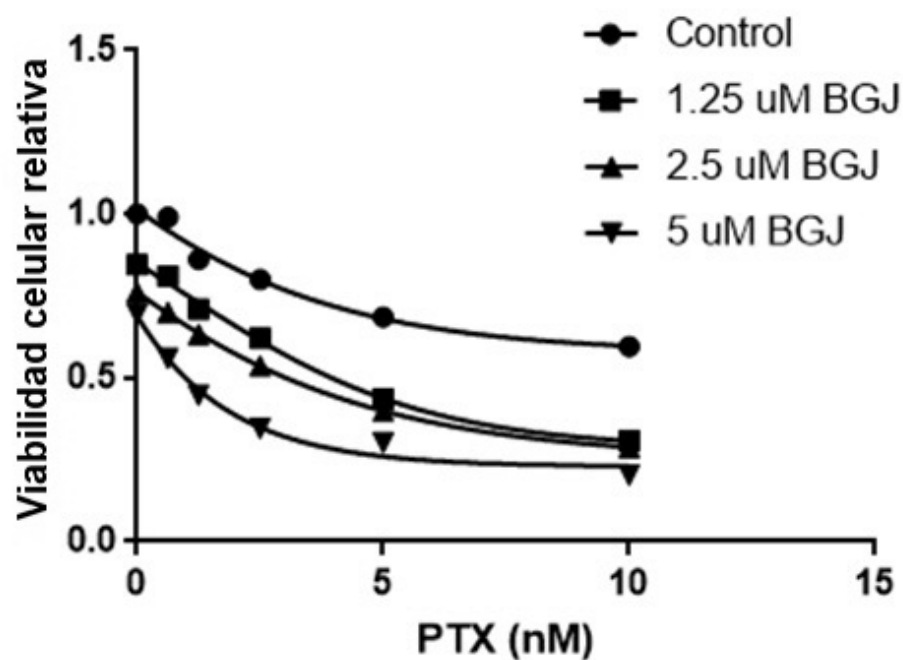
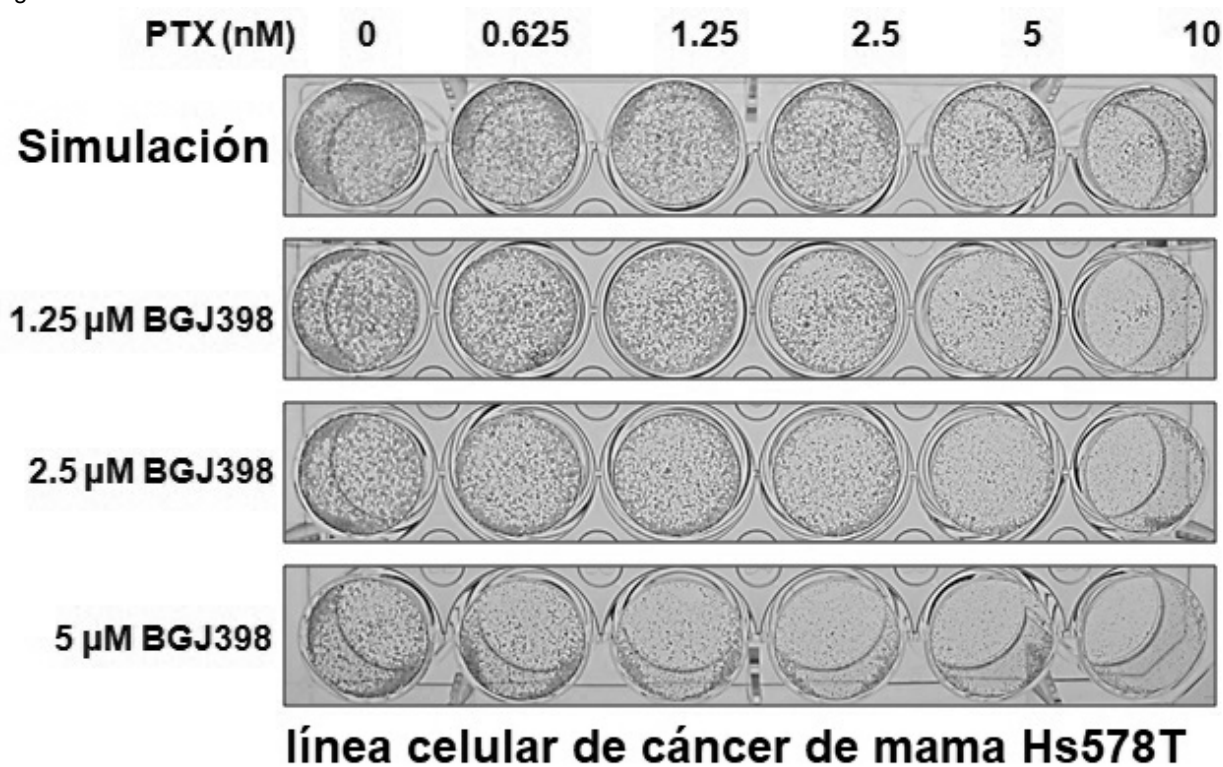


Fig. 14

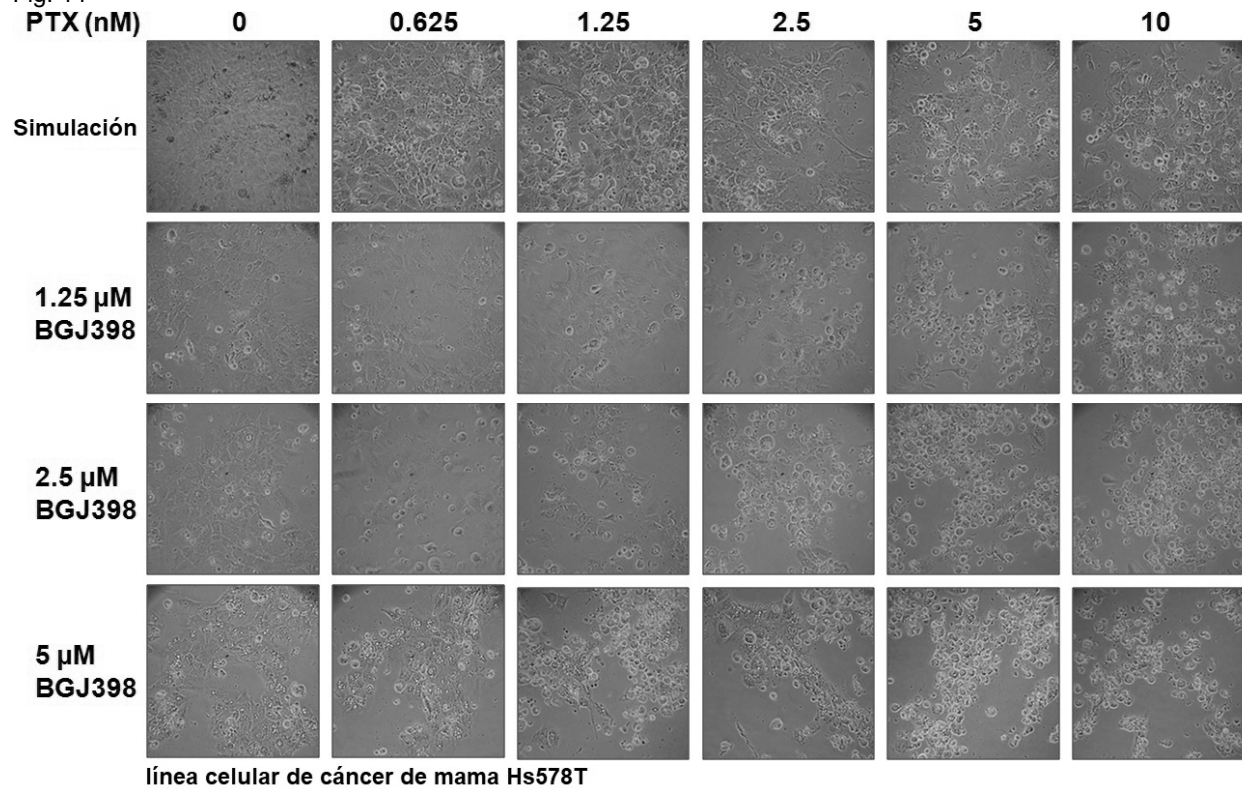


Fig. 15

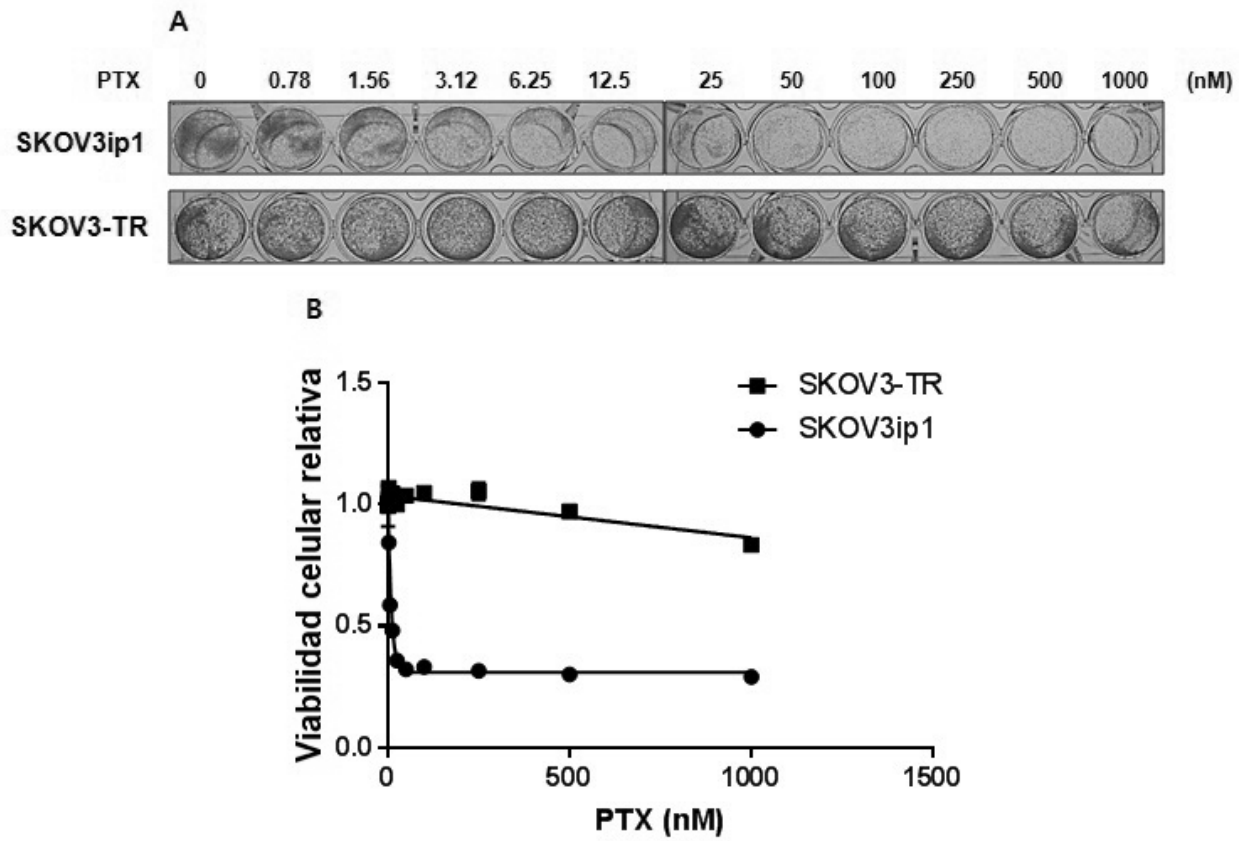


Fig. 16

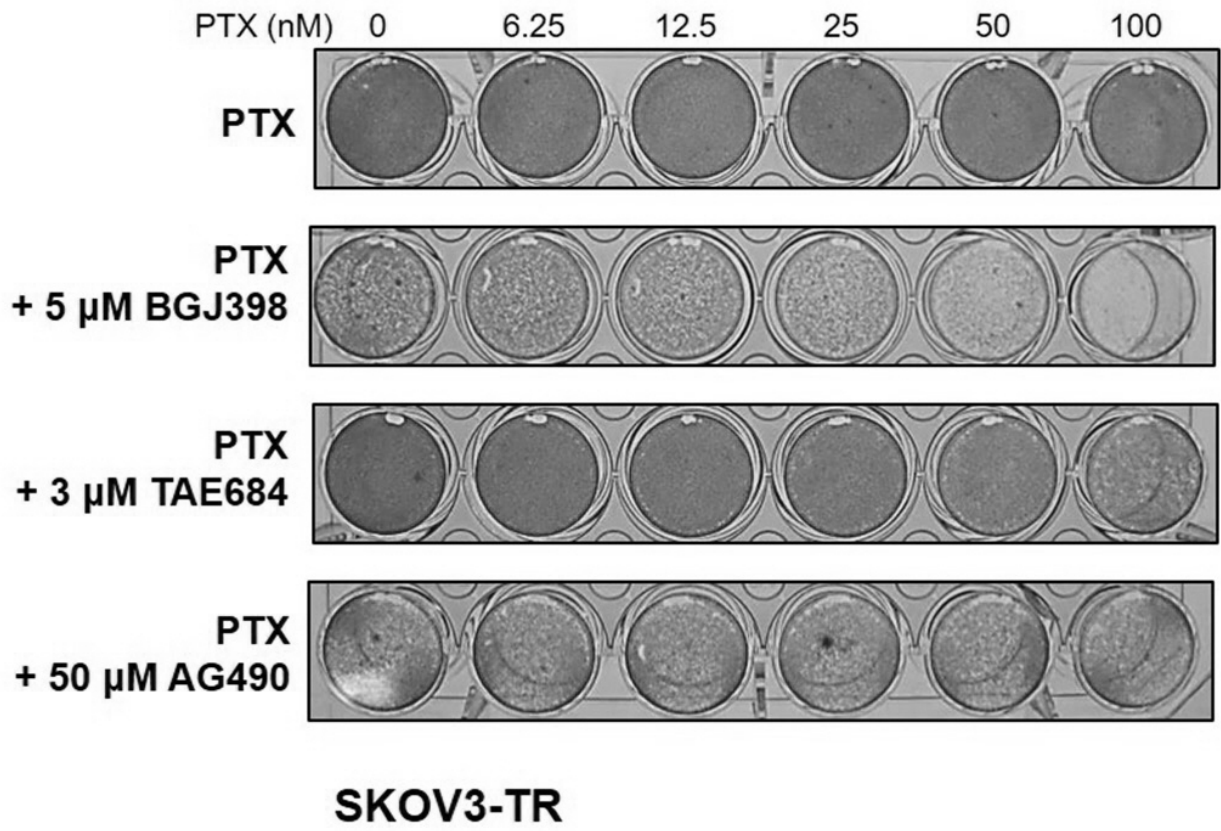


Fig. 17

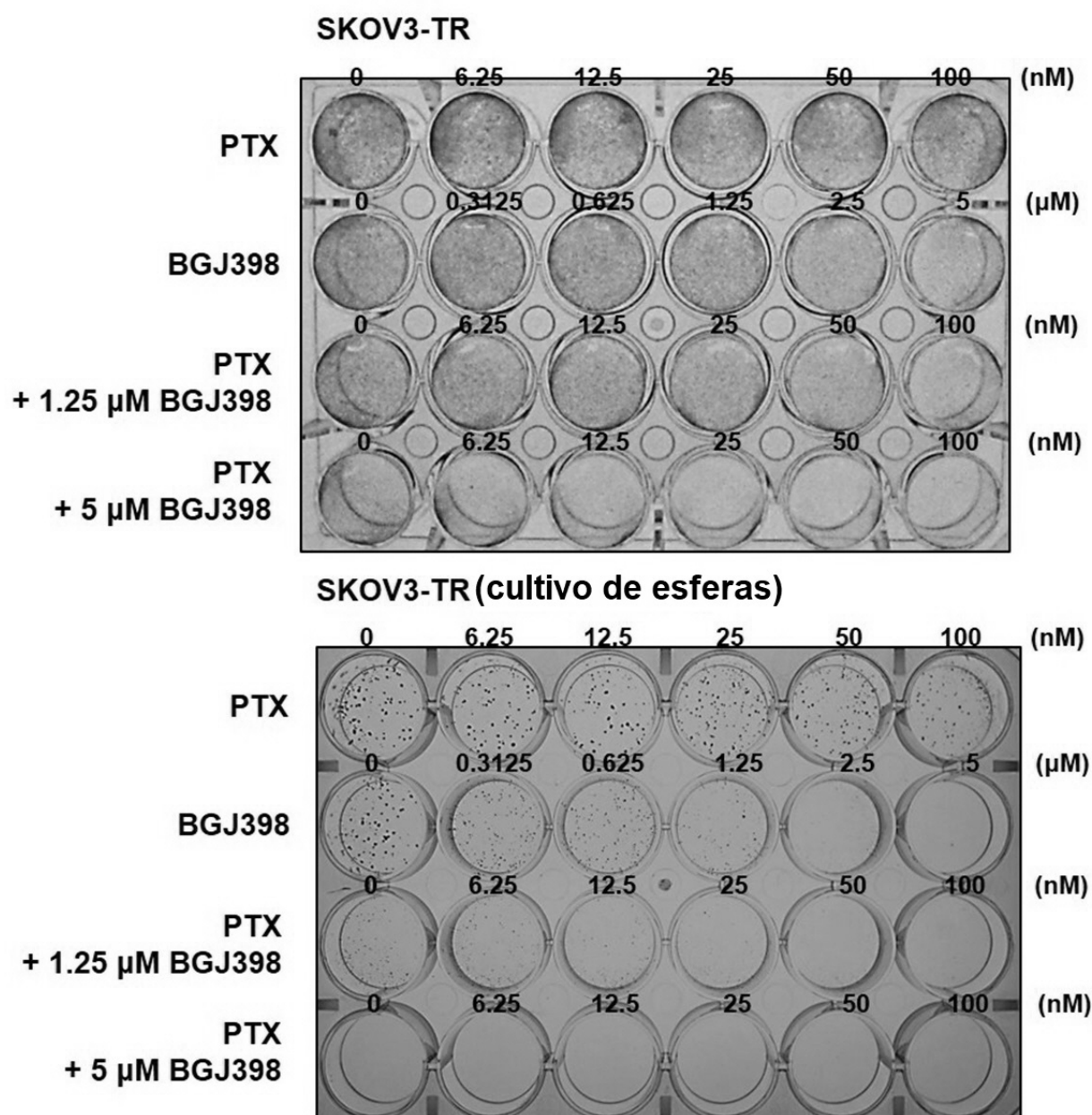


Fig. 18

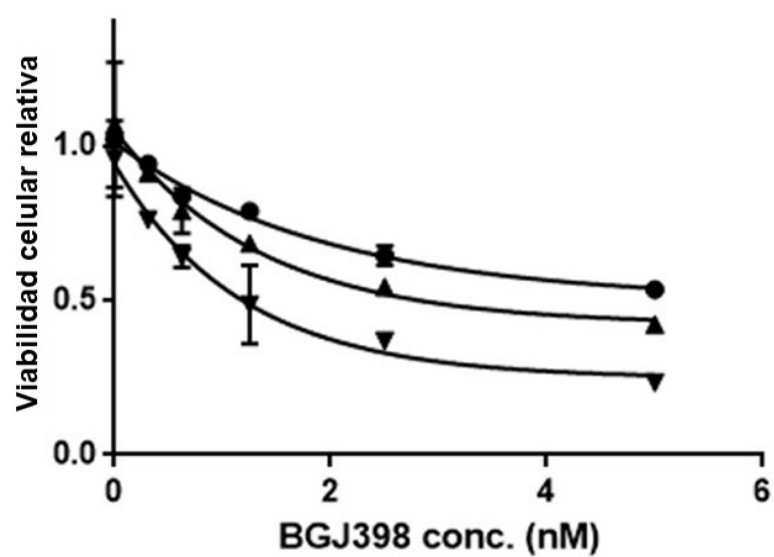
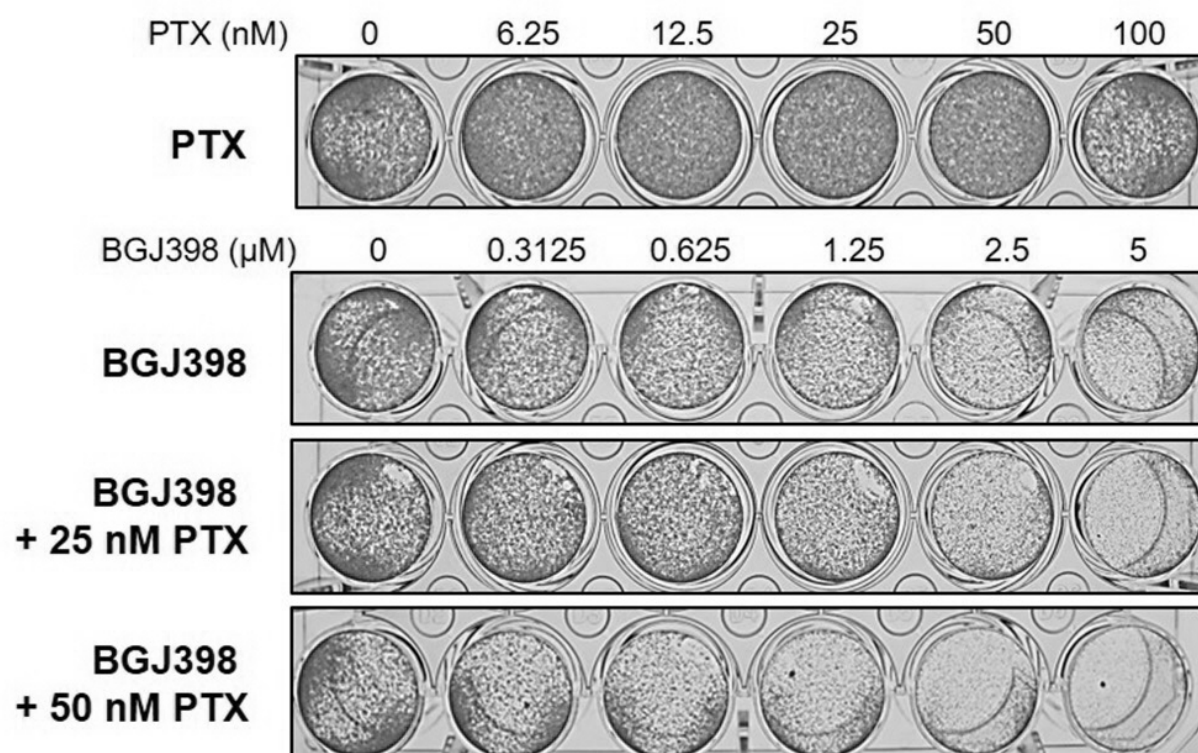


Fig. 19

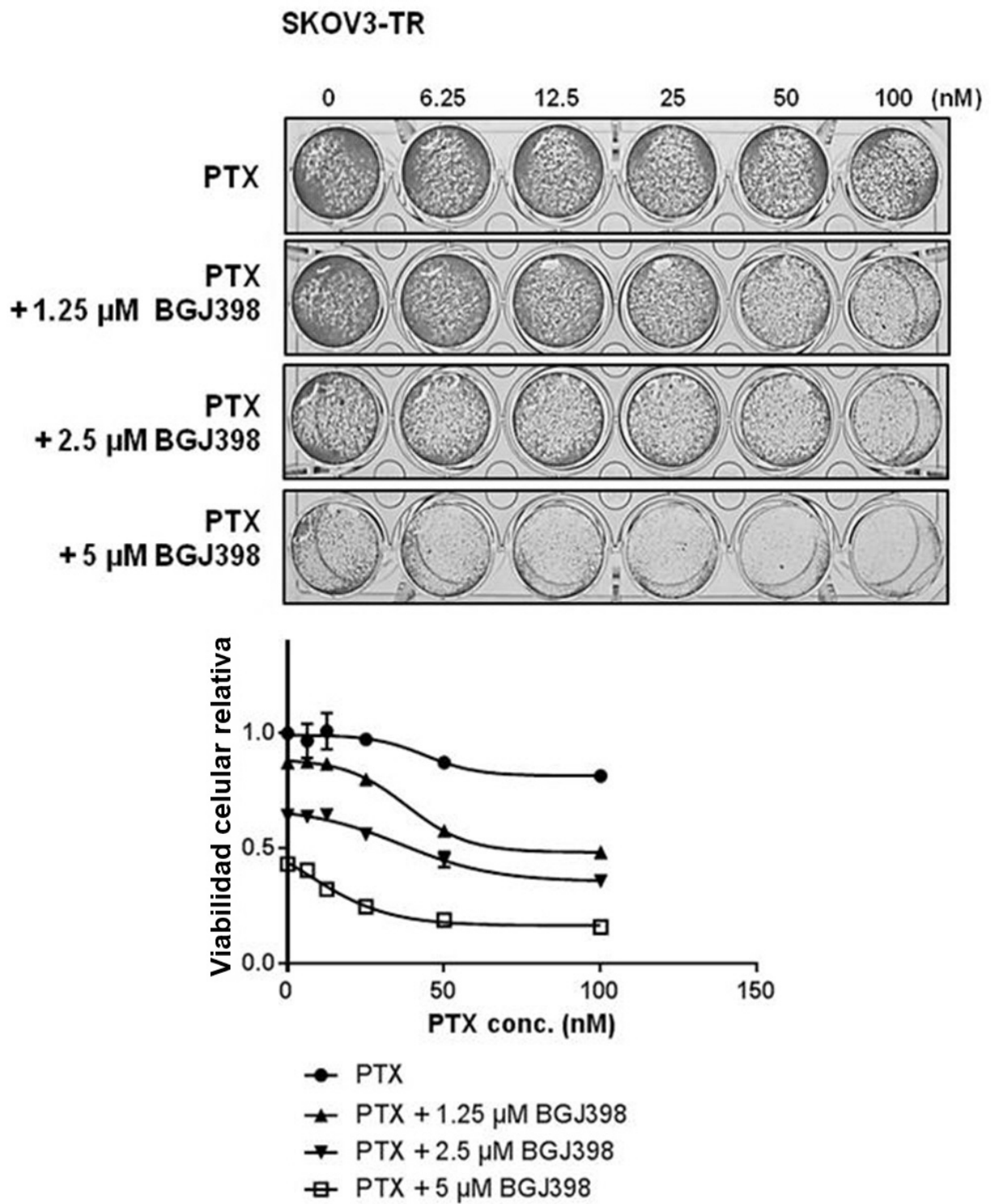
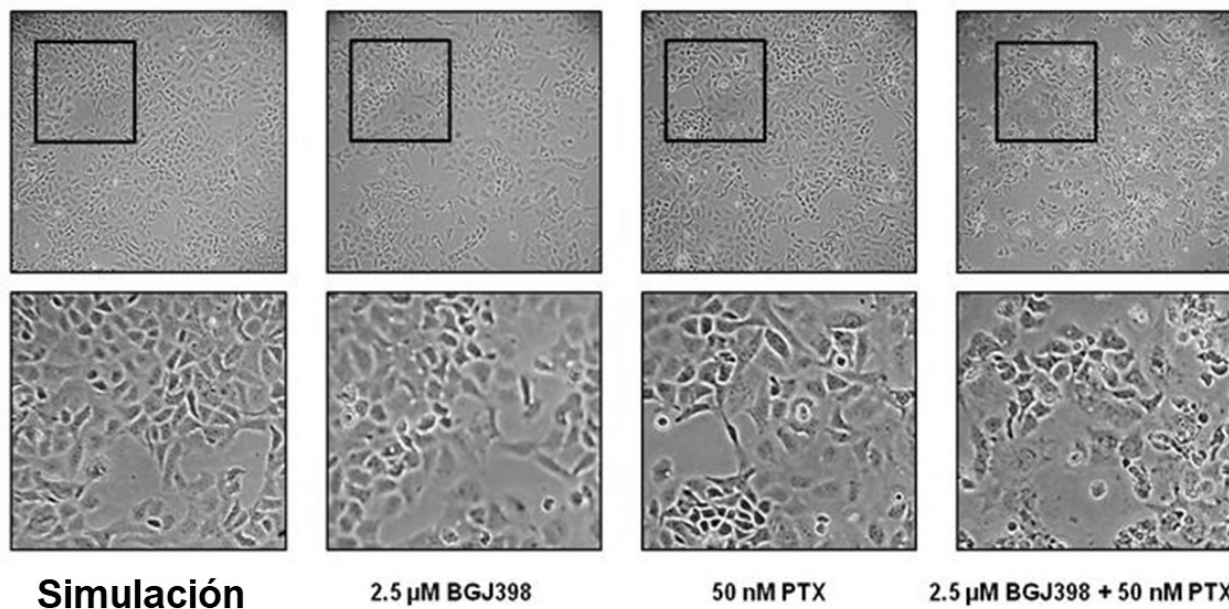


Fig. 20

SKOV3-TR



5 Fig. 21

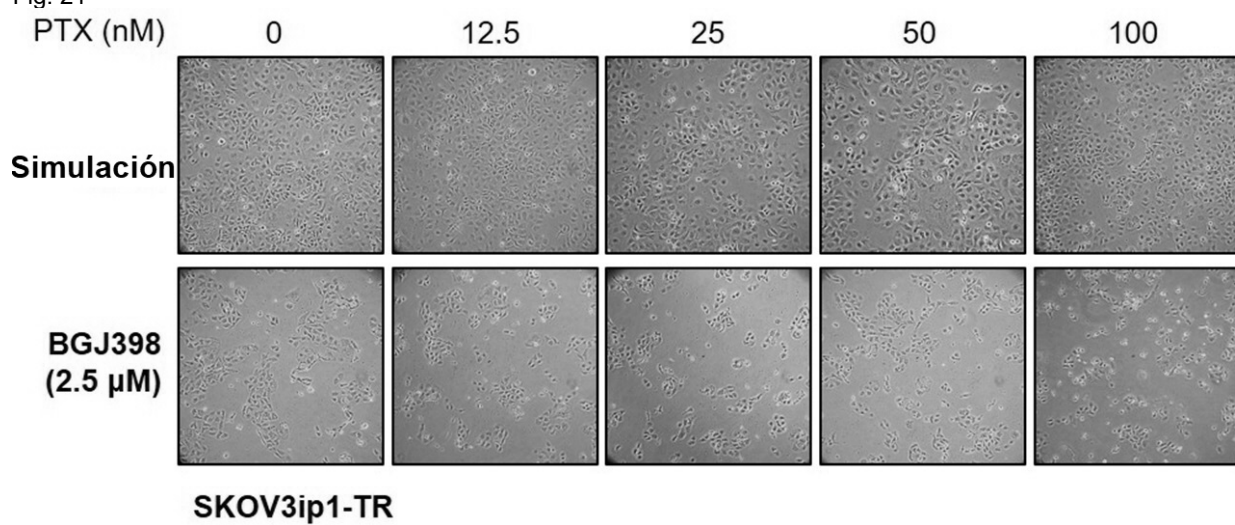


Fig. 22

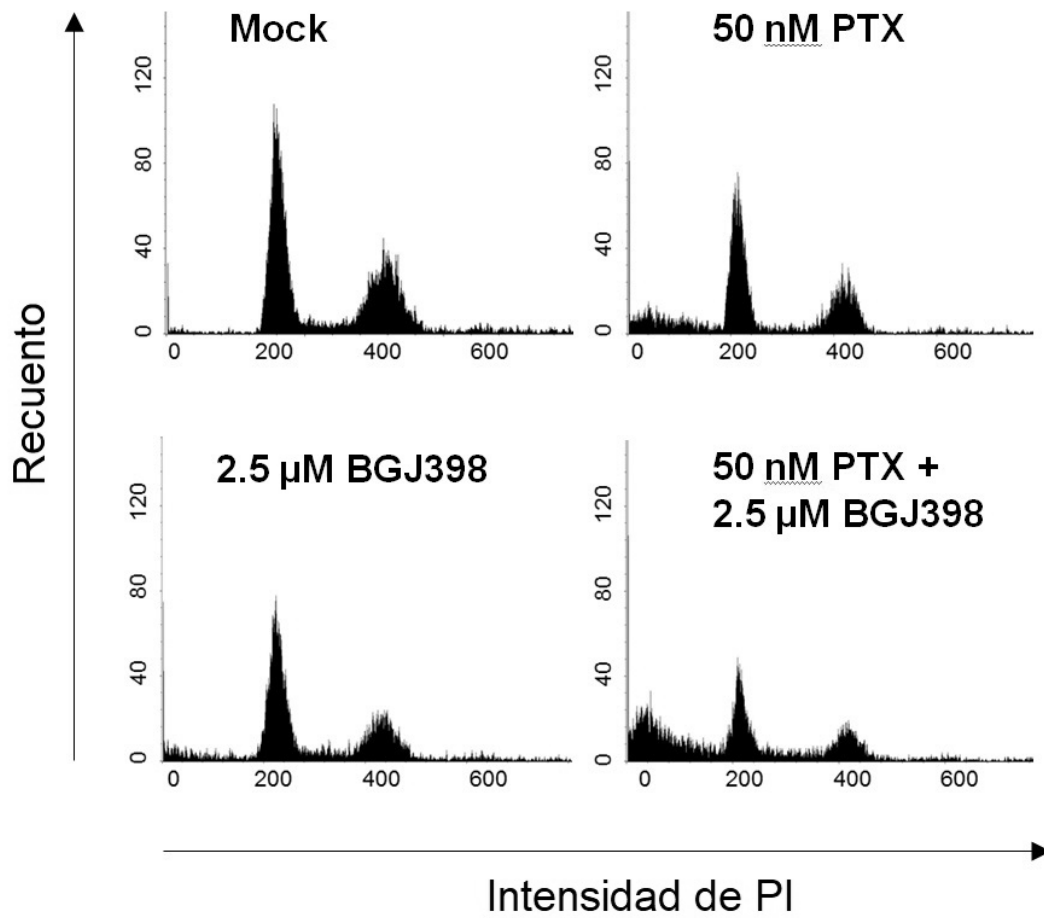


Fig. 23

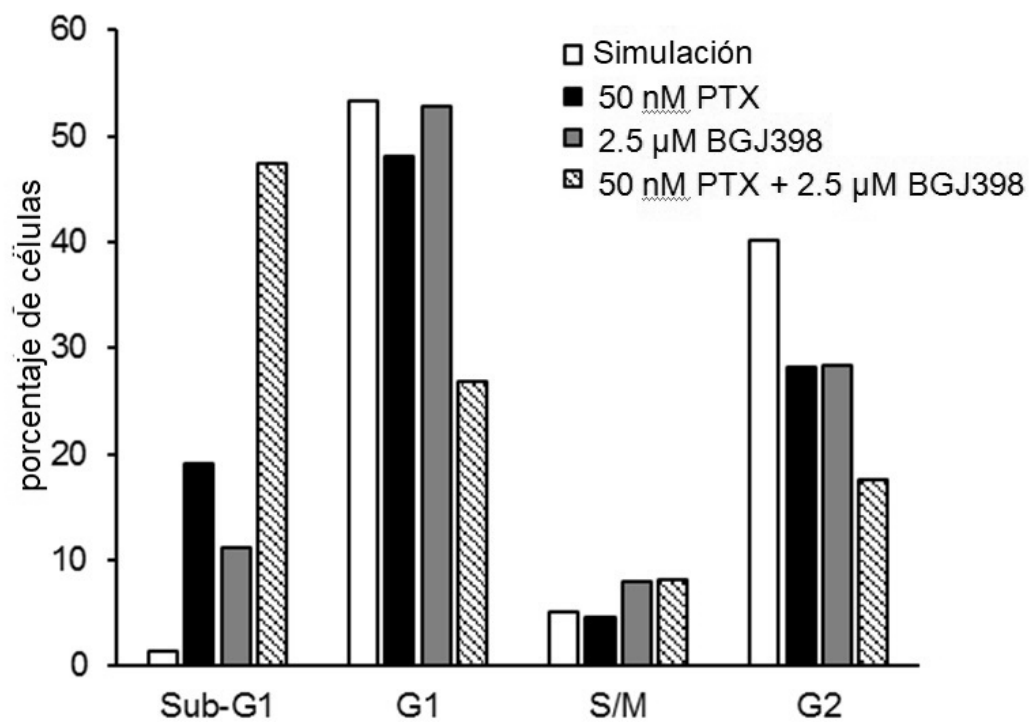


Fig. 24

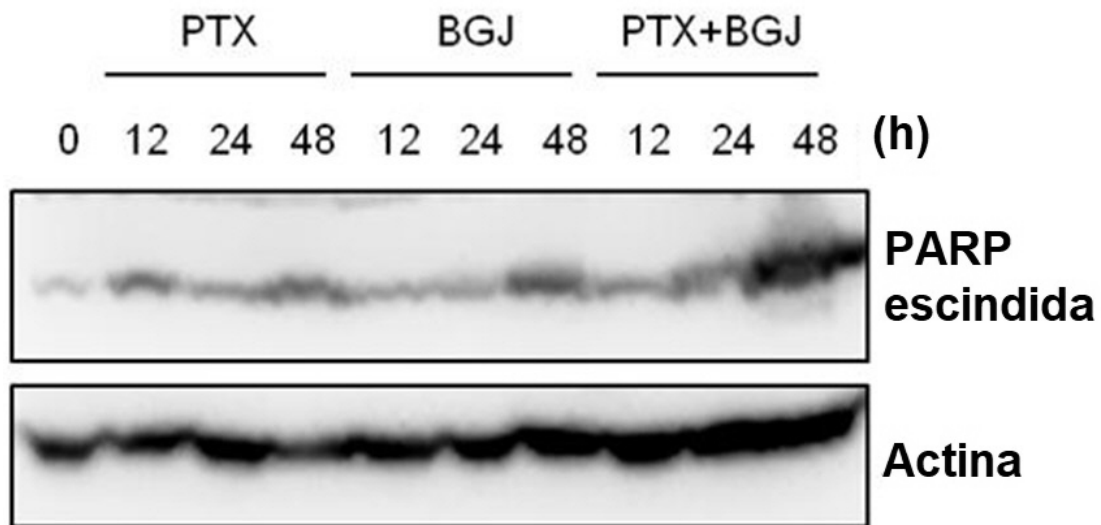


Fig. 25

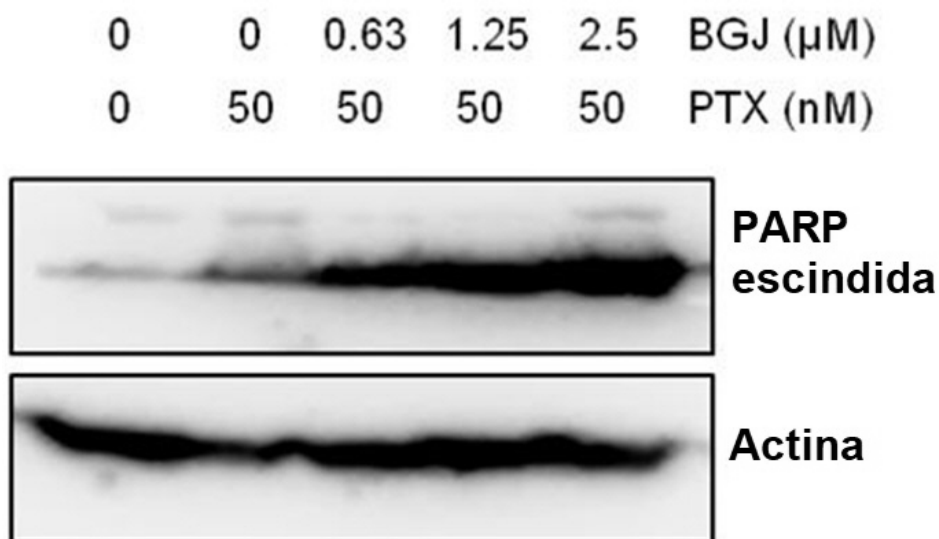


Fig. 26

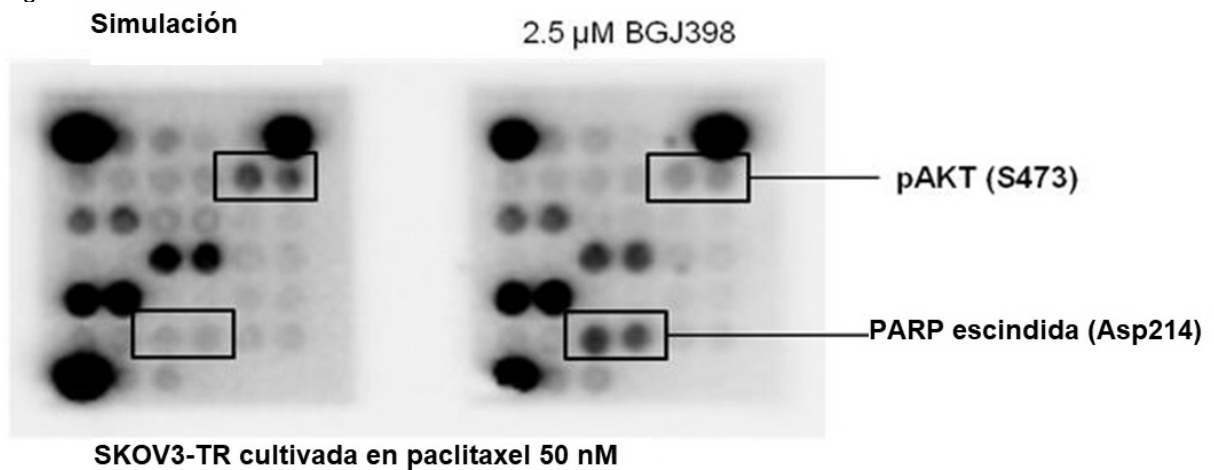
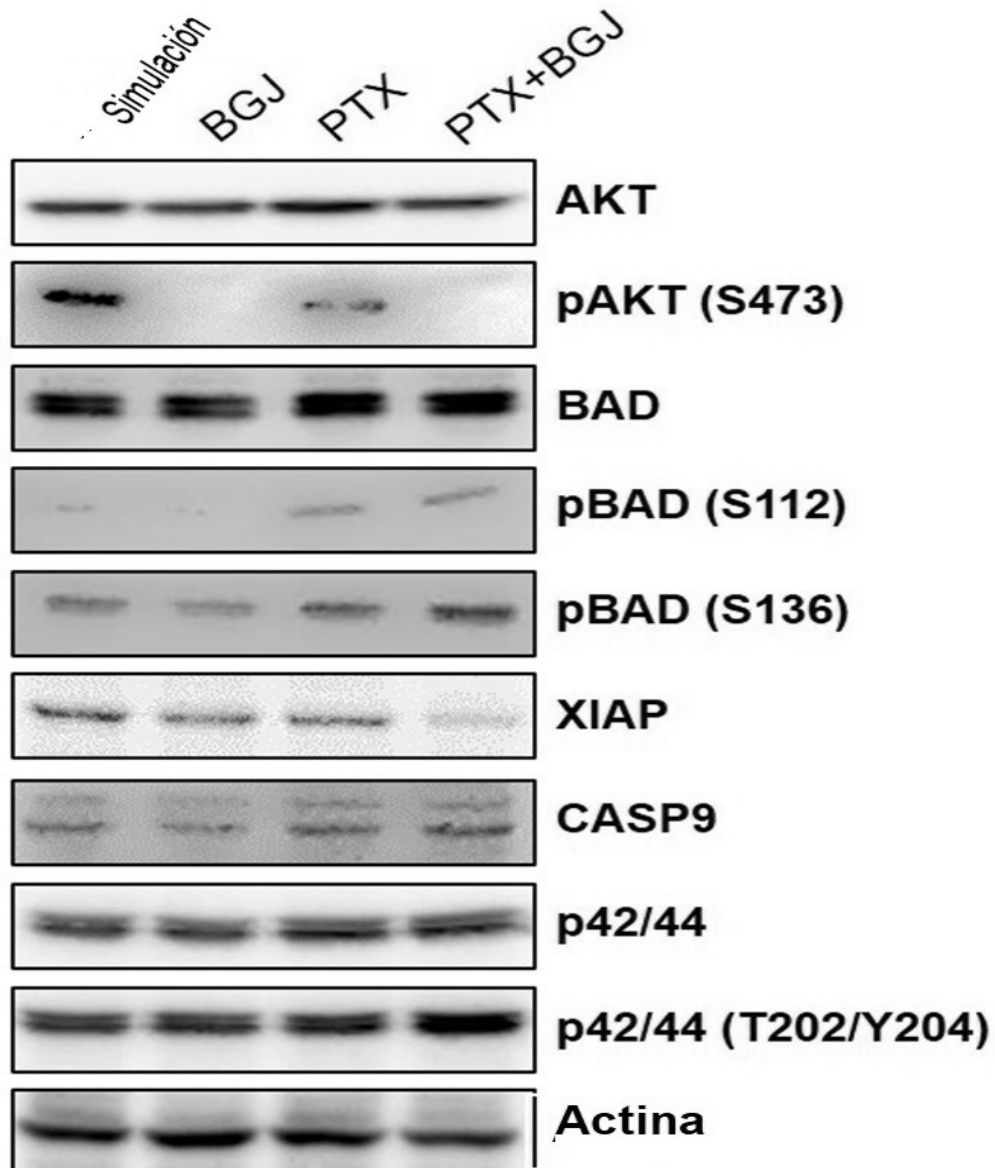


Fig. 27



SKOV3-TR

Fig. 28

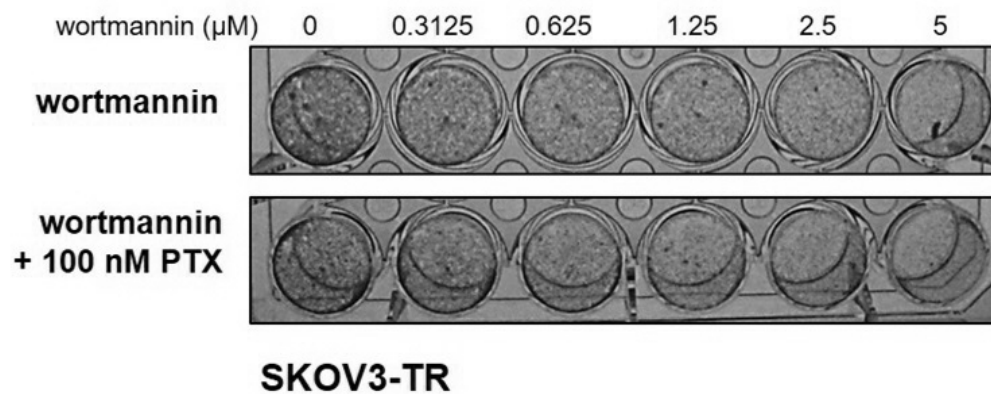


Fig. 29

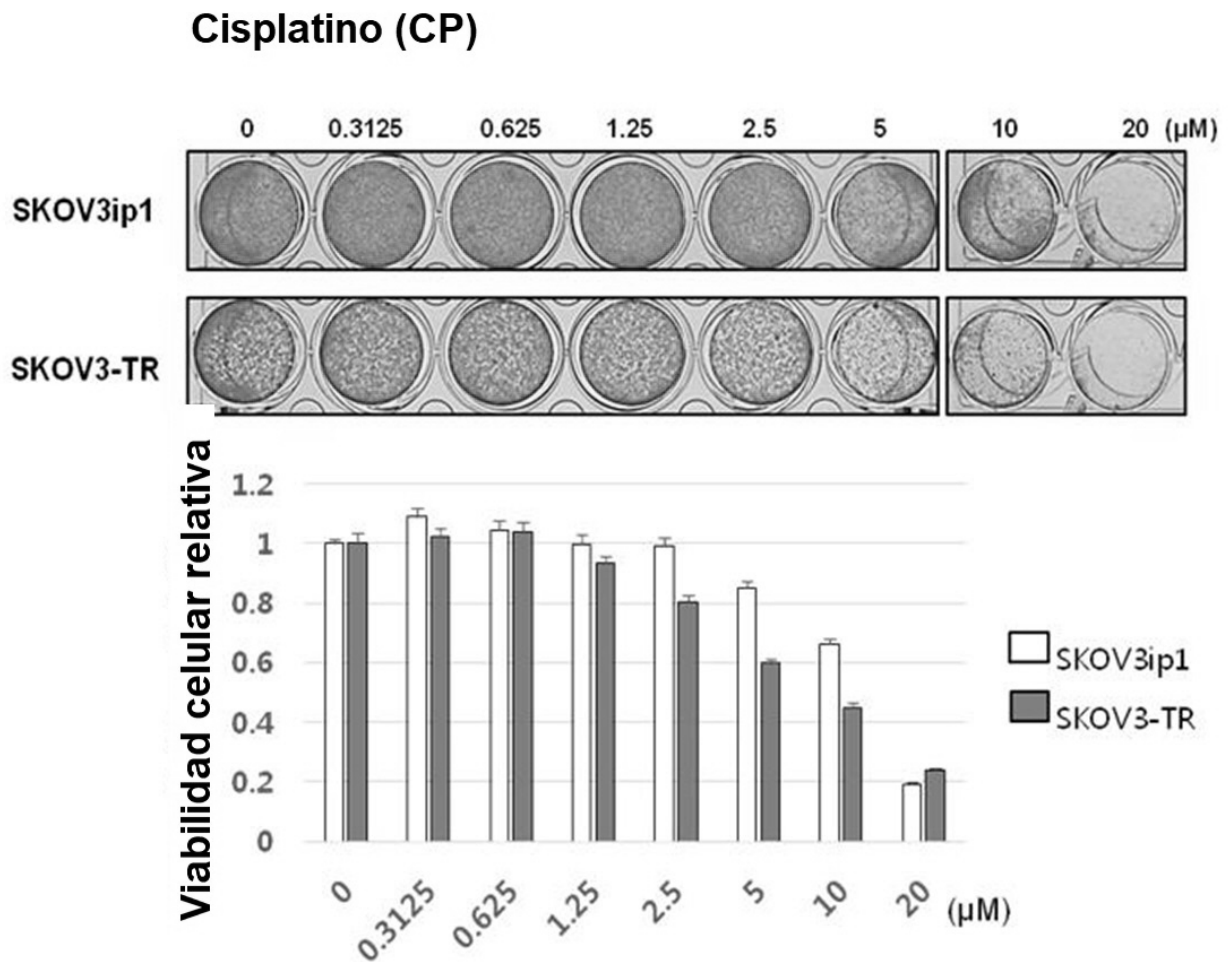


Fig. 30

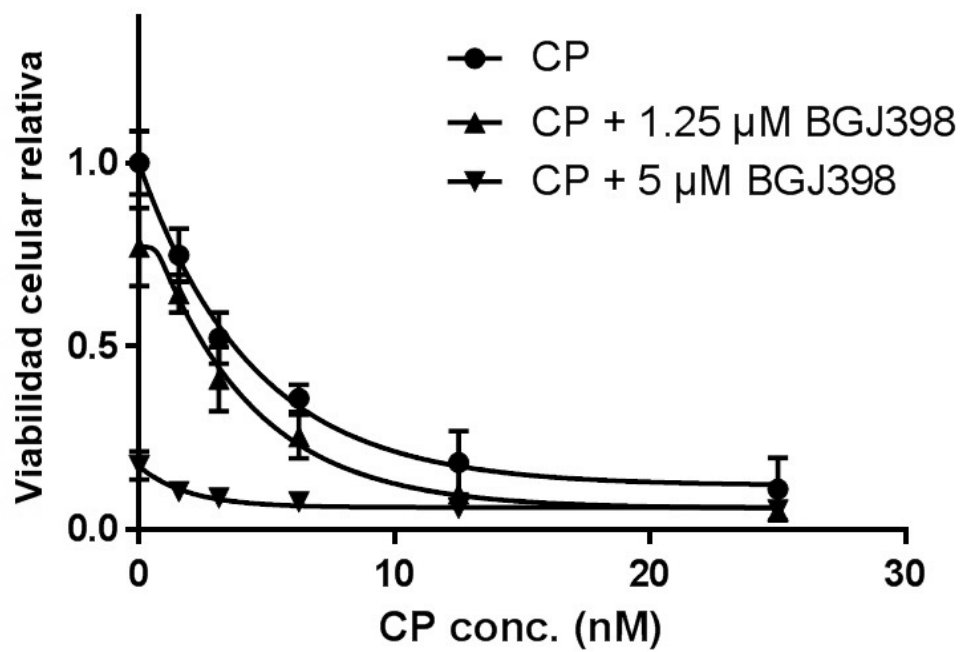


Fig. 31

