

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 880**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/505</b>	(2006.01) <b>A61K 33/24</b>	(2009.01)
<b>A61K 31/506</b>	(2006.01) <b>A61N 5/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/4965</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/497</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/555</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/7048</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/7068</b>	(2006.01)	
<b>A61P 1/18</b>	(2006.01)	
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2012 PCT/US2012/058374**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13049859**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2012 E 12772860 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021 EP 2750679**

54 Título: **Tratamiento de cáncer de páncreas y cáncer de pulmón de células no pequeñas con inhibidores de ATR**

30 Prioridad:

**30.09.2011 US 201161542084 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.03.2022**

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED  
(100.0%)  
50 Northern Avenue  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**POLLARD, JOHN, ROBERT y  
REAPER, PHILIP, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 899 880 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

Tratamiento de cáncer de páncreas y cáncer de pulmón de células no pequeñas con inhibidores de ATR

**Antecedentes de la invención**

El cáncer de páncreas es el décimo sitio más común de nuevos cánceres y es responsable del 6 % de todas las muertes relacionadas con el cáncer. La tasa de supervivencia a 5 años es menor del 5 %.

Las terapias actuales incluyen o bien tratamiento neoadyuvante con quimioterapia (por ejemplo, con gemcitabina) y/o radioterapia o bien extirpación quirúrgica seguida de quimioterapia adyuvante (por ejemplo, con gemcitabina) o radioterapia. Aunque la tasa de supervivencia con el tratamiento de gemcitabina aumenta la supervivencia a 5 años desde el 10 % hasta el 20 %, todavía existe una gran necesidad de mejores terapias para tratar cáncer de páncreas.

Se han sometido a prueba varios compuestos terapéuticos en ensayos de fase II y fase III, aunque los resultados no han sido demasiado prometedores. El tipifarnib, un inhibidor de la farnesiltransferasa oral, no mostró una mejora significativa en la supervivencia global cuando se combinó con gemcitabina. De manera similar, el cetuximab, un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tampoco mostró ningún beneficio clínico cuando se combinó con gemcitabina. Sólo se observó un pequeño aumento de la supervivencia global (6,24 meses frente a 5,91 meses).

El cáncer de pulmón es la segunda forma más común de cáncer y es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es la forma más común de cáncer de pulmón y representa aproximadamente el 85 % de todos los casos de cáncer de pulmón. La mayoría de los pacientes presentan CPCNP avanzado en estadio III o IV con una supervivencia a 5 años del 24 % y el 4 %, respectivamente. Debido a la naturaleza avanzada de la enfermedad en el momento de la presentación, la resección quirúrgica a menudo no es una opción. Para la mayoría de los pacientes, la terapia implica quimioterapia y/o radioterapia. La selección de la quimioterapia es muy variable según el estadio de la enfermedad, los criterios de desempeño del paciente y la preferencia regional geográfica. En la mayoría de los casos, la quimioterapia se basa en un doblete que incluye un agente de platinación tal como cisplatino o carboplatino y un segundo fármaco citotóxico tal como gemcitabina, etopósido o taxotere. Para un pequeño número de pacientes, la terapia puede incluir el tratamiento con agentes que se dirigen a proteínas específicas que están mutadas o desreguladas, tales como ALK y EGFR (por ejemplo, crizotinib, gefitinib y erlotinib). Los pacientes se seleccionan para estos tratamientos basándose en marcadores genéticos o proteómicos. Se ha evaluado un gran número de agentes en estudios clínicos de CPCNP en estadio avanzado, sin embargo, la mayoría ha mostrado muy poco beneficio con respecto a los tratamientos basados en quimioterapia, con una mediana de supervivencia global normalmente de menos de 11 meses.

Por consiguiente, existe una gran necesidad de nuevas estrategias para mejorar los tratamientos del cáncer de páncreas y de pulmón de células no pequeñas.

La cinasa ATR ("relacionada con ATM y Rad3") es una proteína cinasa involucrada en las respuestas celulares a ciertas formas de daño del ADN (por ejemplo, roturas de doble hebra y estrés de replicación). La cinasa ATR actúa con la cinasa ATM ("de ataxia telangiectasia mutada") y muchas otras proteínas para regular la respuesta de una célula a las roturas del ADN bicatenario y al estrés de replicación, denominada comúnmente respuesta al daño del ADN ("RDA"). La RDA estimula la reparación del ADN, fomenta la supervivencia y detiene la progresión del ciclo celular activando puntos de control del ciclo celular, lo que proporciona tiempo para la reparación. Sin la RDA, las células son mucho más sensibles al daño del ADN y mueren fácilmente por las lesiones del ADN inducidas por procesos celulares endógenos tales como la replicación del ADN o agentes que dañan el ADN exógenos usados comúnmente en la terapia contra el cáncer.

Las células sanas pueden depender de una gran cantidad de proteínas diferentes para la reparación del ADN, incluyendo las cinasas de RDA, ATR y ATM. En algunos casos, estas proteínas pueden compensarse entre sí activando procesos de reparación de ADN funcionalmente redundantes. Por el contrario, muchas células cancerosas albergan defectos en algunos de sus procesos de reparación de ADN, tales como la señalización de ATM y, por tanto, muestran una mayor dependencia de sus proteínas de reparación de ADN intactas restantes, que incluyen ATR.

Además, muchas células cancerosas expresan oncogenes activados o carecen de supresores tumorales clave, y esto puede hacer que estas células cancerosas sean propensas a fases desreguladas de la replicación del ADN, que provocan a su vez daño al ADN. ATR se ha implicado como componente crítico de la RDA en respuesta a la replicación del ADN alterada. Como resultado, estas células cancerosas dependen más de la actividad de ATR para sobrevivir que las células sanas. Por consiguiente, los inhibidores de ATR pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer, ya se usen solos o en combinación con agentes que dañan el ADN, porque desactivan un mecanismo de reparación del ADN que es más importante para la supervivencia celular en muchas células cancerosas que en las células normales sanas.

De hecho, se ha demostrado que la alteración de la función de ATR (por ejemplo, mediante delección génica) fomenta la muerte de células cancerosas tanto en ausencia como en presencia de agentes que dañan el ADN. Esto

sugiere que los inhibidores de ATR pueden ser eficaces como agentes individuales y como potentes sensibilizadores a la radioterapia o quimioterapia genotóxica. Reaper *et al.* notifican la destrucción selectiva de células cancerosas deficientes en ATM o p53 a través de la inhibición de ATR (Nature Chemical Biology, 2011, vol. 7, n.º 7, págs. 428-430). Además, el documento WO 2010/071837 A1 da a conocer compuestos de pirazina útiles como inhibidores de la proteína cinasa ATR.

Además, los tumores sólidos suelen contener regiones que son hipóxicas (con bajos niveles de oxígeno). Esto es significativo porque se sabe que las células cancerosas hipóxicas son resistentes al tratamiento, sobre todo al tratamiento con IR, y son muy agresivas. Un motivo para esta observación es que pueden activarse componentes de la RDA en condiciones hipóxicas y también se ha demostrado que las células hipóxicas dependen más de componentes de la RDA para sobrevivir.

Por todos estos motivos, existe la necesidad de desarrollar inhibidores de ATR potentes y selectivos para el tratamiento del cáncer de páncreas, para el tratamiento del cáncer de pulmón y para el desarrollo de agentes que sean eficaces contra células cancerosas tanto hipóxicas como normóxicas.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso del inhibidor de ATR, 822, en combinación con gemcitabina y/o radioterapia para tratar cáncer de páncreas tal como se define en la reivindicación 1, exponiéndose realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes. Esta divulgación se refiere a usos de inhibidores de ATR para tratar cáncer de páncreas y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Con respecto al cáncer de páncreas, esta invención se refiere al inhibidor de ATR, 822, para su uso en métodos de tratamiento de cáncer de páncreas en un paciente (por ejemplo, un ser humano) con el inhibidor de ATR, 822, en combinación con gemcitabina y/o radioterapia. Los solicitantes han demostrado la eficacia sinérgica de los inhibidores de ATR en combinación con gemcitabina y/o radioterapia en ensayos clonogénicos y de viabilidad en las líneas celulares de cáncer de páncreas (por ejemplo, PSN-1, MiaPaCa-2 y Panc-1), así como en una línea tumoral primaria (por ejemplo, Panc-M). La alteración de la actividad de ATR se midió evaluando la fosforilación inducida por daño del ADN de Chk1 (Ser 345) y evaluando los focos de daño del ADN y los focos de RAD51 tras la irradiación.

También se describen en el presente documento como referencia métodos de tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas con un inhibidor de ATR en combinación con cisplatino o carboplatino, etopósido y radiación ionizante. Los solicitantes han demostrado la sinergia de los inhibidores de ATR en combinación con cisplatino, etopósido, gemcitabina, oxaplatino e irinotecán en ensayos de viabilidad contra un panel de 35 líneas celulares de cáncer de pulmón humano, así como eficacia demostrada *in vivo* en un modelo de ratón con cáncer de pulmón en combinación con cisplatino.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. VE-821 radiosensibiliza células tumorales pancreáticas.

A) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la inhibición de Chk1.

Se trataron células con gemcitabina 100 nM durante 1 h, se añadió VE-821 1  $\mu$ M 1 h más tarde y se irradiaron las células (6 Gy) 1 h después de eso. Se dejaron los fármacos durante la duración del experimento y se lisaron las células 2 h después de la irradiación y se sometieron a análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western.

B) VE-821 radiosensibiliza células tumorales pancreáticas pero no fibroblastos normales.

Se trataron las líneas celulares de cáncer de páncreas PSN-1, Panc-1, MiaPaCa-2 y fibroblastos MRC5 con concentraciones crecientes de VE-821 durante 96 h en combinación con o sin radiación de 4 Gy 1 h después de la adición de VE-821. Se midió la viabilidad celular después de 8 días y se mostró normalizada con respecto a las células tratadas con DMSO.

C) El VE-821 pautado afecta a la radiosensibilidad.

Se sembraron células PSN-1 en placas como células individuales, se trataron con VE-821 1  $\mu$ M en diferentes puntos de tiempo en relación con la irradiación de 4 Gy y se evaluó la formación de colonias después de 10 días. Se determinó la fracción superviviente a 4 Gy para cada una de las pautas de tratamiento teniendo en cuenta la eficiencia de siembra en placa relevante de las células no irradiadas.

D) Supervivencia clonogénica de células de cáncer de páncreas en respuesta a la inhibición de ATR. Se trataron células con VE-821 1  $\mu$ M 4 h después de la siembra en placa y 1 h antes de la irradiación. Se retiró el fármaco después de 72 horas y se evaluó la capacidad de formación de colonias después de 10 a 21 días. ( $n=3$ ). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$  con respecto al control tratado con DMSO.

Figura 2. VE-821 radiosensibiliza células tumorales pancreáticas en condiciones hipóxicas.

A) curvas de supervivencia clonogénica de células tratadas con VE-821 1  $\mu$ M e irradiación en condiciones hipóxicas.

Se transfirieron las células sembradas en placa a hipoxia (el 0,5 % de O<sub>2</sub>) y se aclimataron durante 6 h. Entonces, se añadió VE-821 (1 µM) 1 h antes de la irradiación y se dejó durante 72 h, tras lo cual se reemplazó el medio. Se transfirieron las células a normoxia 1 h después de la irradiación.

- 5 B) supervivencia clonogénica de las células después de la irradiación con 6 Gy y el tratamiento con VE-821 1 µM en condiciones óxicas e hipóxicas (el 0,5 % de O<sub>2</sub>), tal como se describió anteriormente y en la figura 1 (n=3). \*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001 con respecto al control tratado con DMSO.

Figura 3. VE-821 sensibiliza células de cáncer de páncreas al tratamiento con gemcitabina.

- 10 A) supervivencia clonogénica de células tratadas con gemcitabina y VE-821 1 µM. Se trataron células con concentraciones crecientes de gemcitabina durante 24 h, seguido de un tratamiento de 72 h con VE-821 1 µM. Se evaluó la capacidad de formación de colonias después de 10 a 21 días.

B) supervivencia clonogénica de células tratadas con gemcitabina en hipoxia. Se transfirieron las células sembradas en placa a hipoxia (el 0,5 % de O<sub>2</sub>) y se aclimataron durante 6 h. Entonces, se trataron células con concentraciones crecientes de gemcitabina durante 24 h, seguido de un tratamiento durante 72 h de VE-821 1 µM. Se transfirieron las células hipóxicas a normoxia 1 h después de la adición de VE-821.

- 15 C) supervivencia clonogénica después del tratamiento con gemcitabina 20 nM y VE-821 en condiciones óxicas e hipóxicas (el 0,5 % de O<sub>2</sub>), tal como se describió anteriormente.

- 20 D) supervivencia clonogénica de células tratadas con gemcitabina e irradiación. Se trataron células PSN-1 y MiaPaCa-2 con gemcitabina 5 nM o 10 nM, respectivamente, durante 24 h, luego se reemplazó el medio y se añadió VE-821 1 µM desde 1 h antes hasta 72 h después de la irradiación con 4 Gy. Se evaluó la capacidad de formación de colonias después de 10 a 21 días (n=3). \*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001 con respecto al control tratado con DMSO.

Figura 4. VE-821 perturba el punto de control del ciclo celular inducido por irradiación en las células de cáncer de páncreas.

- 25 Se añadió VE-821 (1 µM) 1 h antes de la irradiación de 6 Gy y se dejó durante la duración del experimento. Se levantaron las células y se fijaron a las 12 h o 24 h después de la irradiación, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron para determinar la distribución del ciclo celular mediante citometría de flujo (n = 3)

Figura 5. VE-821 aumenta el número de focos 53BP1 y γH2AX y reduce la formación de focos de RAD51.

- 30 Se trataron células con VE-821 1 µM en diversos puntos de tiempo en relación con la irradiación de 6 Gy, tal como se indicó, y se fijaron 24 h después de la irradiación. Posteriormente, se tiñeron las células para los focos (A) de γH2AX y (B) de 53BP1 y se cuantificó el porcentaje de células con más de 7 y 5 focos por célula, respectivamente. C, para analizar la formación de focos de Rad51, se fijaron las células a las 6 h después de la irradiación y se cuantificó el porcentaje de células con más de 9 focos por célula. Se muestran imágenes representativas a la derecha (n = 3). \*, P <0.05

#### Figuras complementarias.

- 35 Figura 1 comp. Efecto del tiempo de incubación de VE-821 sobre la eficiencia de la siembra en placa.

Se sembraron células PSN-1 en placas como células individuales, se trataron con VE-821 1 µM durante diversos periodos de tiempo y se evaluó la formación de colonias después de 10 días.

Figura 2 comp.

- 40 VE-821 perturba el punto de control de G2/M inducido por irradiación en células de cáncer de páncreas en condiciones hipóxicas.

Se preincubaron las células en condiciones hipóxicas (el 0,5 % de O<sub>2</sub>) durante 6 h y se añadió VE-821 1 µM 1 h antes de la irradiación (6 Gy). Se transfirieron las células a normoxia 1 h después de la irradiación y se levantaron y fijaron a las 12 h o 24 h después de la irradiación, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron para determinar la distribución del ciclo celular mediante citometría de flujo (n = 3).

- 45 Figura 1X. Relación dosis-respuesta para la radiosensibilidad inducida por los compuestos 821 y 822.

- 50 Se realizaron ensayos de supervivencia clonogénica a pequeña escala en células HeLa tratadas con los diferentes inhibidores de ATR a concentraciones crecientes seguidos de irradiación a 6 Gy. Los datos se representan gráficamente como una disminución de la supervivencia clonogénica en relación con las células tratadas con DMSO tanto para células irradiadas (SF 6Gy, línea con cuadrados) como para las no irradiadas (eficacia de siembra en placa, PE; línea de color negro). Un alto grado de radiosensibilidad aumentada puede verse como una gran

disminución de la supervivencia después de la irradiación acompañada de una pequeña disminución de la supervivencia no irradiada a una concentración de fármaco específica.

Figura 2X. Evaluación de la radiosensibilidad en células tumorales y células normales.

5 A) Supervivencia clonogénica después del tratamiento farmacológico en ausencia de irradiación. Se sembraron células PSN1 y MiaPaca en placas a bajas densidades, se trataron con los fármacos indicados y se evaluó la supervivencia clonogénica.

B) Supervivencia clonogénica de células PSN1, MiaPaca y MRC5 pretratadas con fármacos de los compuestos 821, 822, 823 y 824 seguido de irradiación. Se sembraron las células en placas a bajas densidades, se trataron con los fármacos indicados 1 h antes de la irradiación y se evaluó la supervivencia clonogénica.

10 Figura 3X. Evaluación de la dependencia del tiempo de adición y retirada de fármacos de la radiosensibilidad.

Se sembraron células MiaPaca en placas a bajas densidades y se añadió el fármaco en diversos puntos de tiempo en relación con el tratamiento con radiación de 4 Gy: 1 h antes de IR, 5 min después de IR, 2 h o 4 h después de IR; y se retira en diversos puntos de tiempo: 5 min después, 1 h después o 19 h después de IR. Se evaluó la supervivencia clonogénica después de 14 días. Los resultados se muestran como la fracción superviviente a 4 Gy (panel superior) o el porcentaje de radiosensibilización (panel central) en comparación con las células tratadas con DMSO. Las diferentes pautas de tratamiento no provocaron diferencias en la eficiencia de siembra en placa (panel inferior).

Figura 4X. Análisis de focos de daño en el ADN después del tratamiento con el compuesto 822 y la irradiación.

20 A) Evaluación de los focos de gH2AX, 53BP1 a las 24 h después de IR a 6 Gy y de los focos de RAD51 a las 6 h después de IR. Se trataron células MiaPaca con el compuesto 822 80 nM 1 h antes o 1 h después de la irradiación y se retiró por lavado el fármaco 5 min después o 1 h después de IR. Se fijaron las células después de 6 h (para los focos de RAD51) o 24 h (para los focos de gH2AX y 53BP1). Se cuantificó el porcentaje de células que contenían más de un cierto número de focos.

25 B) Transcurso temporal de los focos de daño del ADN. Se trataron células como en A y se fijaron en los puntos de tiempo mostrados, seguido de tinción para los focos de gH2AX, 53BP1 y RAD51. Los datos se muestran como el número medio de focos en un punto de tiempo particular (paneles superiores) o el porcentaje de células que contienen más de un cierto número de focos (paneles inferiores).

Figura 5X. Análisis del ciclo celular de células tratadas con el compuesto 822 después de la irradiación con 6 Gy.

30 Se trataron células PSN1 con el compuesto 822 40 nM 1 h antes de la irradiación con 6 Gy en pocillos por triplicado. Se levantaron las células y fijaron en varios puntos de tiempo después de IR, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo.

A) Gráficos de histograma del ciclo celular. Los picos ajustados son de color gris oscuro para la fase G1, sombreados para la fase S y gris claro para la fase G2/M. Se muestra uno de cada tres pocillos para cada punto de tiempo y tratamiento.

35 B) Porcentajes promedio del ciclo celular a lo largo del tiempo. Se obtuvieron valores porcentuales del ciclo celular a partir de gráficos de histograma ajustados ( $n = 3$ ) y se representaron gráficamente para las células tratadas con control y las tratadas con el compuesto 822.

Figura 6X. Volumen tumoral de MiaPaCa a lo largo del tiempo para el compuesto 822.

Figura 7X y 8X. Volumen tumoral de PSN-1 a lo largo del tiempo para el compuesto 822.

40 Figura 1Y. Detección de células de cáncer de pulmón: VE-822 actúa de manera sinérgica con compuestos quimioterápicos a lo largo de un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón en un ensayo de viabilidad de células pulmonares

Figura 2Y. Detección de células de cáncer de pulmón: VE-822 presenta una sinergia mayor que el triple con compuestos quimioterápicos en líneas celulares de cáncer de pulmón en un ensayo de viabilidad celular

45 Figura 3Y. Detección de células de cáncer de páncreas: VE-822 actúa de manera sinérgica con cisplatino y gemcitabina en líneas celulares de cáncer de páncreas en un ensayo de viabilidad celular

Figura 4Y. Detección de células de cáncer de páncreas: VE-822 muestra una sinergia mayor que el triple con compuestos quimioterápicos en líneas celulares de cáncer de páncreas en un ensayo de viabilidad celular

50 Figura 5Y. Efecto de VE-822 y cisplatino sobre el volumen tumoral y el peso corporal en un xenoinjerto de CPCNP de adenocarcinoma primario en ratones SCID.

Figura 6Y: Efecto de VE-822 administrado por v.o. q2d a 10, 30 o 60 mg/kg en combinación con gemcitabina (15 mg/kg por vía i.v. q3d) sobre el volumen tumoral de ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de páncreas PSN1.

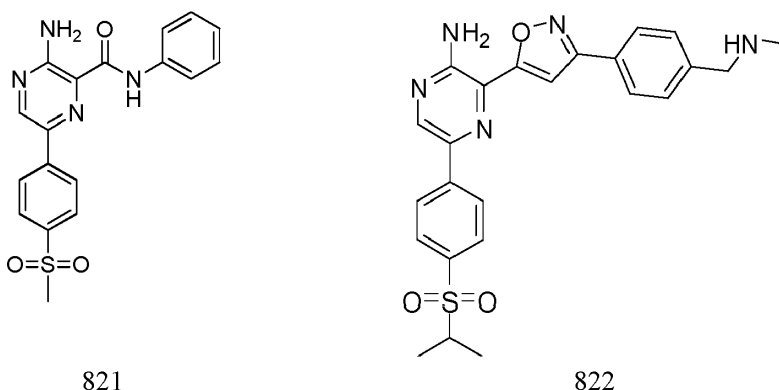
### Descripción detallada de la invención

- 5 Un aspecto de esta divulgación proporciona métodos para tratar cáncer de páncreas en un paciente mediante la administración al paciente de un inhibidor de ATR en combinación con otro tratamiento conocido del cáncer de páncreas. Un aspecto de la invención incluye la administración del inhibidor de ATR, 822, en combinación con gemcitabina. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas comprende una de las siguientes líneas celulares: PSN-1, MiaPaCa-2 o Panc-1. Según otro aspecto, el cáncer comprende la línea tumoral primaria Panc-M.
- 10 Otro aspecto de la invención proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en métodos para tratar cáncer de páncreas en un paciente mediante la administración al paciente del inhibidor de ATR, 822, en combinación con radioterapia.

También se describen en el presente documento como referencia métodos para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas en un paciente mediante la administración al paciente de un inhibidor de ATR en combinación con cisplatino o carboplatino, etopósido y/o radiación ionizante. Los solicitantes han demostrado la sinergia de los inhibidores de ATR en combinación con cisplatino, etopósido, gemcitabina, oxaliplatino e irinotecán en ensayos de viabilidad contra un panel de 35 líneas celulares de cáncer de pulmón humano, así como eficacia demostrada *in vivo* en un modelo de ratón con cáncer de pulmón en combinación con cisplatino. También se describe en el presente documento como referencia el uso de inhibidores de ATR en combinación con cisplatino o carboplatino, etopósido y/o radiación ionizante para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En la tabla 1 a continuación se muestran ejemplos de inhibidores de ATR:

Tabla 1



25 Los términos que se refieren a los compuestos 821 y 822 son intercambiables con VE-821 y VE-822, respectivamente.

Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de tratamiento del cáncer de páncreas mediante la administración a las células de cáncer de páncreas del inhibidor de ATR, 822, en combinación con una o más terapias contra el cáncer. En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR se combina con quimiorradioterapia, quimioterapia y/o radioterapia. Tal como entenderá un experto en la técnica, la quimiorradioterapia se refiere a un régimen de tratamiento que incluye tanto quimioterapia (tal como gemcitabina) como radiación. En la presente invención, la quimioterapia es gemcitabina.

Aún otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método para aumentar la sensibilidad de las células de cáncer de páncreas a una terapia contra el cáncer seleccionada entre gemcitabina o radioterapia mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, en combinación con la terapia contra el cáncer.

35 En algunas realizaciones, la terapia contra el cáncer es gemcitabina. En otras realizaciones, la terapia contra el cáncer es radioterapia. En aún otra realización, la terapia contra el cáncer es quimiorradioterapia.

Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de inhibición de la fosforilación de Chk1 (Ser 345) en una célula de cáncer de páncreas que comprende administrar el inhibidor de ATR, 822, después del tratamiento con gemcitabina (por ejemplo, 100 nM) y/o radiación (por ejemplo, 6 Gy) a una célula de cáncer de páncreas.

Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de radiosensibilización de células tumorales PSN-1, MiaPaCa-2 o PancM hipóxicas mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, a la célula

tumoral en combinación con radioterapia.

Otro aspecto más proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de sensibilización de células tumorales PSN-1, MiaPaCa-2 o PancM hipóxicas mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, a la célula tumoral en combinación con gemcitabina.

- 5 Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de sensibilización de células tumorales PSN-1 y MiaPaCa-2 a la quimiorradioterapia mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, a las células tumorales en combinación con quimiorradioterapia.

- 10 Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de alteración de puntos de control del ciclo celular inducidos por daño mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, en combinación con radioterapia a una célula de cáncer de páncreas.

Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de inhibición de la reparación del daño del ADN mediante recombinación homóloga en una célula de cáncer de páncreas mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, en combinación con uno o más de los siguientes tratamientos: quimiorradioterapia, quimioterapia y radioterapia.

- 15 En la presente invención, la quimioterapia es gemcitabina.

Otro aspecto proporciona el inhibidor de ATR, 822, para su uso en un método de inhibición de la reparación del daño del ADN mediante recombinación homóloga en una célula de cáncer de páncreas mediante la administración del inhibidor de ATR, 822, en combinación con gemcitabina y radioterapia.

- 20 En algunas realizaciones, las células de cáncer de páncreas se derivan de una línea de células pancreáticas seleccionada de PSN-1, MiaPaCa-2 o Panc-1.

En otras realizaciones, las células de cáncer de páncreas se encuentran en un paciente con cáncer. En otras realizaciones, las células cancerosas forman parte de un tumor.

- 25 También se describen en el presente documento como referencia métodos para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas en un paciente mediante la administración al paciente de un inhibidor de ATR en combinación con otros tratamientos conocidos de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Un aspecto de la divulgación incluye administrar a un paciente un inhibidor de ATR en combinación con cisplatino o carboplatino, etopósido y/o radiación ionizante.

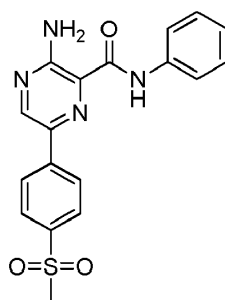
- 30 También se describe en el presente documento como referencia un método para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas mediante la administración a un paciente de un inhibidor de ATR seleccionado de un compuesto de la tabla 1 en combinación con una o más terapias contra el cáncer. En algunas realizaciones, el inhibidor de ATR se combina con quimiorradioterapia, quimioterapia y/o radioterapia. Tal como entenderá un experto en la técnica, la quimiorradioterapia se refiere a un régimen de tratamiento que incluye tanto quimioterapia (tal como cisplatino, carboplatino o etopósido) como radiación. En algunas realizaciones, la quimioterapia comprende cisplatino o carboplatino y etopósido.

- 35 También se describe en el presente documento como referencia un método para aumentar la sensibilidad de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas a una terapia contra el cáncer seleccionada de cisplatino o carboplatino, etopósido y radiación ionizante mediante la administración a un paciente de un inhibidor de ATR seleccionado de un compuesto de la tabla 1 en combinación con una o más terapias contra el cáncer.

En otras realizaciones, la terapia contra el cáncer es radioterapia.

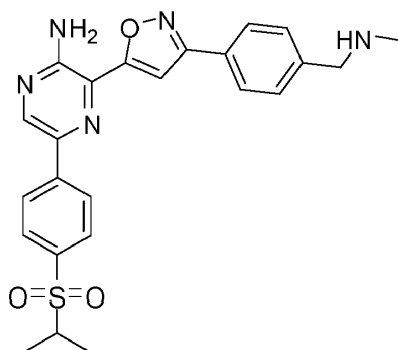
- 40 En otras realizaciones, las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas se encuentran en un paciente con cáncer.

Se describe en el presente documento el inhibidor de ATR



821

En la presente invención, el inhibidor de ATR es



822.

#### Usos

Otro aspecto proporciona el uso del inhibidor de ATR, 822, 1 en combinación con gemcitabina y radioterapia para tratar cáncer de páncreas.

También se describe en el presente documento como referencia el uso de un inhibidor de ATR seleccionado de un compuesto de la tabla 1 en combinación con cisplatino o carboplatino, etopósido y radiación ionizante para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En algunas realizaciones, como referencia, el inhibidor de ATR es el compuesto VE-821. En la presente invención, el inhibidor de ATR es el compuesto VE-822.

#### Fabricación de medicamentos

Otro aspecto proporciona el uso del inhibidor de ATR, 822, en combinación con gemcitabina y radioterapia para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer de páncreas.

#### Ejemplos

##### Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron células MiaPaCa-2, PSN-1, Panc1 y MRC5 ( $5 \times 10^4$ ) en placas de 96 pocillos y después de 4 h se trataron con concentraciones crecientes de VE-821 1 h antes de la irradiación con una dosis única de 6 Gy. Se reemplazó el medio 96 h después de la irradiación, punto en el que se midió la viabilidad usando el ensayo Alamar Blue (sustrato de resazurina, SIGMA). Se permitió que las células proliferasen y se analizó la viabilidad celular de nuevo el día 8 para las diferentes condiciones de tratamiento. Se normalizaron la viabilidad celular y la fracción superviviente con respecto al grupo no tratado (control).

##### Ensayo de supervivencia clonogénica

Se sembraron células con crecimiento en fase logarítmica por triplicado en placas de cultivo tisular de 6 pocillos e condiciones óxicas (el 21 % de  $O_2$ ) o hipóxicas (el 0,5 % de  $O_2$ ) usando una cámara InVivo2 300 (Ruskin Technology, R.U.). Se incubaron las células durante 6 horas antes de la irradiación con oxia o hipoxia usando cámaras herméticamente selladas. Se alcanzó el nivel de  $O_2$  objetivo en el plazo de 6 h desde la gasificación y se mantuvo durante la irradiación, según se confirmó mediante una sonda de oxígeno OxyLite (Oxford Optronix). Se expusieron las células irradiadas con hipoxia a normoxia 1 h después de la irradiación. Como patrón, se añadió VE-821 ( $1 \mu M$ ) 1 h antes de la irradiación (6 Gy) y se retiró por lavado 72 h después de la irradiación. Para los experimentos de quimioterapia, se expusieron las células inicialmente a concentraciones crecientes de gemcitabina (5, 10 y 20 nM) durante 24 h antes de la adición de VE-821 ( $1 \mu M$ ) durante otras 72 h. También se examinó el efecto de la combinación triple de irradiación con VE-821 y gemcitabina. Se incubaron las células durante 10-21 días hasta que se tiñeron las colonias con violeta cristal al 0,5 % y se contaron en un contador de colonias automático CellCount (Oxford Optronix). Se calculó la supervivencia clonogénica y se ajustaron los datos en GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, CA).

##### Inmunotransferencia de tipo Western

Se expusieron células MiaPaCa-2 y PSN-1 a gemcitabina y/o al fármaco VE-821  $1 \mu M$  1 h antes de la irradiación con una dosis única de 6 Gy. Se lisaron las células en tampón RIPA 2 h después de la irradiación y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencia. Se usó quimioluminiscencia (SuperSignal, Millipore) y exposición de película para detectar la unión del anticuerpo. Se digitalizó la película expuesta y se ensamblaron las figuras usando Microsoft PowerPoint.

Análisis de focos nucleares

- Se trataron células en crecimiento en placas de 96 pocillos con el fármaco VE-821 1  $\mu$ M 1 h antes de la irradiación con 6 Gy y se fijaron en formaldehído al 3 % en múltiples puntos de tiempo. Posteriormente, se permeabilizaron las células y se bloquearon en PBS con Triton al 0,1 %, BSA al 1 % (p/v). Se incubaron las células con anticuerpo primario durante la noche a 4 °C y después de un lavado con PBS se incubaron con anticuerpo secundario marcado con fluorescencia seguido de un lavado con PBS y tinción nuclear con DAPI. Se adquirieron imágenes y se cuantificaron los focos usando un software de análisis y microscopio de epifluorescencia automatizado IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare, Calfont St. Giles, R.U.)

Análisis del ciclo celular

- Se trataron células en crecimiento en placas de 6 pocillos con el fármaco VE-821 1  $\mu$ M 1 h antes de la irradiación con 6 Gy. Se incubaron las células durante 6 h antes de la irradiación con oxia (el 21 % de O<sub>2</sub>) o hipoxia (el 0,5 % de O<sub>2</sub>) usando cámaras herméticamente selladas. En múltiples puntos de tiempo, se levantaron las células en tripsina y se fijaron en etanol al 70 % y se almacenaron a 4 °C. Se incubaron las células con yoduro de propidio (50  $\mu$ g/ml en PBS que contenía ARNasa 200  $\mu$ g/ml) durante 1 h a temperatura ambiente y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSort, Becton Dickinson). Se cuantificó la fase del ciclo celular usando el software ModFit Cell Cycle Analysis.

Siembra de células y adición de compuestos para la detección de células de cáncer de pulmón

- Se sembraron todas las líneas celulares en 30  $\mu$ l de medio de cultivo tisular que contenía FBS al 10 % en placas de ensayo de fondo opaco de 384 pocillos. La densidad de siembra se basó en la tasa de crecimiento logarítmica de cada línea celular. Después de 24 horas, se añadieron disoluciones madre de compuesto a cada pocillo para proporcionar una matriz que consistía en 5 concentraciones para VE-822 y 6 concentraciones para compuestos quimiotóxicos. Cada pocillo contiene o bien un agente solo o bien una combinación de ambos agentes. El intervalo de concentración final para VE-822 fue de 25 nM-2  $\mu$ M. Los intervalos de concentración de los compuestos quimiotóxicos fueron los siguientes: etopósido, 10 nM-10  $\mu$ M; gemcitabina, 0,16 nM-160 nM; cisplatino, 20 nM-20  $\mu$ M; oxaliplatino, 40 nM-40  $\mu$ M; irinotecán (SN-38), 0,12 nM-120 nM. Entonces, se incubaron las células durante 96 horas a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> y el 95 % de humedad.

Siembra de células y adición de compuestos para la detección de células de cáncer de páncreas

- Se sembraron todas las líneas celulares en 30  $\mu$ l de medio de cultivo tisular que contenía FBS al 10 % en placas de fondo opaco de 384 pocillos. La densidad de siembra se basó en la tasa de crecimiento logarítmica de cada línea celular. Después de 24 horas, se añadieron disoluciones madre de compuesto a cada pocillo para proporcionar una matriz que consistía en 9 concentraciones para VE-822 y 7 concentraciones para gemcitabina y cisplatino. Cada pocillo contiene o bien un agente solo o bien una combinación de ambos agentes. Los intervalos de concentración final fueron los siguientes: VE-822, 0,3 nM-2  $\mu$ M; gemcitabina, 0,3 nM-0,22  $\mu$ M; cisplatino, 30 nM-20  $\mu$ M. Entonces, se incubaron las células durante 96 horas a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> y el 95 % de humedad.

Ensayo de viabilidad celular

Este ensayo mide el número de células viables en un cultivo basándose en la cuantificación de ATP, que está presente en las células metabólicamente activas.

- Se preparó el reactivo CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se añadió 96 horas después de la adición del compuesto (25  $\mu$ l/pocillo) para medir la viabilidad celular. Se midió la señal de luminiscencia con el lector de placas automático PHERAStarFS (BMG Labtech, Cary, NC, EE.UU.). Se detectaron todas las líneas celulares por duplicado.

- Se normalizaron los valores de CellTiter-Glo (CTG) de luminiscencia sin procesar con respecto al valor de CTG medio para las muestras de control negativo tratadas con DMSO en cada placa de ensayo. Se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> de compuesto quimiotóxico solo usando valores de supervivencia celular normalizados con respecto a DMSO para las muestras tratadas con compuesto quimiotóxico solo. Para determinar la fracción de supervivencia celular en presencia de VE-822, se normalizaron los valores de CTG sin procesar con respecto al valor de CTG medio para las muestras expuestas a la misma concentración de VE-822 en ausencia del compuesto quimiotóxico. Se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> del compuesto quimiotóxico tratado con VE-822 usando valores de supervivencia celular normalizados con respecto a VE-822 para todas las muestras tratadas con el compuesto quimiotóxico a una concentración dada de VE-822. Se usó una reducción de 3 veces o más en CI<sub>50</sub> para identificar efectos fuertemente sinérgicos entre VE-822 y compuestos quimiotóxicos.

Modelo de xenoinjerto de CPCNP de adenocarcinoma primario

- Se extirpó tejido tumoral de un paciente con un adenocarcinoma poco diferenciado. Este tejido tumoral se implantó por vía subcutánea en el flanco de un ratón SCID y se sometió a pases dos veces antes de las pruebas con compuestos. Para las pruebas con compuestos, se implantó tejido tumoral de pase dos por vía subcutánea en el

flanco de ratones SCID y los tumores crecieron hasta un volumen de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>. Se dosificó cisplatino solo a o bien 1 o bien 3 mg/kg por vía i.p., una vez a la semana (i.p., q7d, el día 2 de cada semana) durante dos semanas. Se dosificó VE-822 como una disolución sola a 60 mg/kg por v.o. en 4 días consecutivos por ciclo semanal (qd4, dosificado los días 1, 2, 3 y 4 cada semana). Dos grupos de combinación recibieron cisplatino a 1 o 3 mg/kg más VE-822 a 60 mg/kg por v.o. con la misma pauta que el grupo de agente individual. Un grupo de control recibió vehículo solo (10 % de vitamina E TPGS en agua, por v.o. qd4). Se detuvo cualquier tratamiento con el fármaco el día 28. Se sacrificaron los grupos de vehículo, cisplatino (1 mg/kg) y VE-822 (60 mg/kg) y se monitorizó el resto durante 40 días más para evaluar el nuevo crecimiento tumoral.

#### Modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas PSN1

Se implantaron células PSN1 (1 x 10<sup>6</sup> células por ratón) como una mezcla en Matrigel (100 µl por ratón) en el flanco de ratones MF1 desnudos hembra y se hicieron crecer hasta un volumen de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup> antes de la administración del compuesto. Se dosificó gemcitabina sola a 15 mg/kg por vía i.p., una vez cada tres días (i.p., q3d) en metilcelulosa al 0,5 % en agua durante un máximo de 10 ciclos. Se dosificó VE-822, como una suspensión en metilcelulosa al 0,5 % en agua, solo a o bien 10, 30 o bien 60 mg/kg por v.o. cada dos días durante 28 días (v.o., q2d). Tres grupos de combinación recibieron gemcitabina a 15 mg/kg más VE-822 a o bien 10, 30 o bien 60 mg/kg por v.o. con la misma pauta que los grupos de agente individual. Un grupo de control recibió vehículo solo (metilcelulosa al 0,5 % por vía i.p. q3d). Se detuvo cualquier tratamiento con fármaco el día 30. Los grupos de vehículo y VE-822 se sacrificaron el día 13 debido a los volúmenes tumorales excesivos.

#### RESULTADOS

##### Los compuestos VE-821 y VE-822 sensibilizan células de cáncer de páncreas a la radioterapia

El compuesto VE-821 inhibe la fosforilación de Chk1 (Ser 345) después del tratamiento con gemcitabina (100 nM), radiación (6 Gy) o ambos (véase la figura 1A). El compuesto VE-821 radiosensibiliza células tumorales pancreáticas pero no células normales. Cuando se irradiaron las células en presencia del compuesto VE-821, se observó una disminución de la fracción superviviente y este efecto de radiosensibilización aumentó a medida que se extendía el tiempo de incubación con fármaco después de la irradiación (véase la figura 1C).

El compuesto VE-821 radiosensibiliza células tumorales PSN-1, MiaPaCa-2 y PancM en condiciones hipóxicas (véanse las figuras 2A-B). El compuesto VE-821 también sensibiliza células cancerosas normóxicas e hipóxicas a la gemcitabina (véanse las figuras 3B-C). El compuesto VE-821 potencia el efecto de la quimiorradioterapia en células cancerosas PSN-1 y MiaPaCa-2 (véase la figura 3D). El compuesto VE-821 altera los puntos de control del ciclo celular inducidos por daño (véase la figura 2 complementaria). El compuesto VE-821 inhibe la reparación del daño del ADN por recombinación homóloga (véanse las figuras 5A, 5B y 5C).

Los resultados para los compuestos 821 y 822 se muestran en las figuras 1X a 8X y 1Y a 6Y. VE-821 y VE-822 sensibilizan células cancerosas a la radioterapia (véanse las figuras 1X-5X).

##### VE-822 potencia los efectos antitumorales de las terapias contra el cáncer en modelos de xenoinjerto

VE-822 potencia los efectos antitumorales de la radiación ionizante en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas MiaPaCa (véase la figura 6X) y en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas PSN-1 (véanse las figuras 7X y 8X).

VE-822 potencia los efectos antitumorales del cisplatino en un modelo de xenoinjerto de CPCNP de adenocarcinoma primario. La figura 5Y muestra el efecto de VE-822 y cisplatino sobre el volumen tumoral y el peso corporal en un xenoinjerto de CPCNP de adenocarcinoma primario en ratones SCID. Los datos son la media ± eem, n = 9-10. Los círculos rellenos de color negro son tratamientos con vehículo; los rombos rellenos y la línea continua son el tratamiento con cisplatino (1 mg/kg, q7d); los rombos sin relleno y la línea continua son el tratamiento con cisplatino (3 mg/kg, q7d); los cuadrados sin relleno son el tratamiento con VE-822 (60 mg/kg, qd4); los rombos rellenos y la línea discontinua son cisplatino (1 mg/kg) y VE-822 (60 mg/kg, qd4); los rombos vacíos y la línea discontinua son cisplatino (3 mg/kg) y VE-822 (60 mg/kg, qd4) (véase la figura 5Y).

VE-822 también potencia los efectos antitumorales de la gemcitabina en un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas PSN1. La figura 6Y muestra el efecto de VE-822 administrado por v.o. q2d a 10, 30 o 60 mg/kg en combinación con gemcitabina (15 mg/kg, por vía i.p. q3d) sobre el volumen tumoral de ratones portadores de xenoinjertos de cáncer de páncreas PSN1. Los datos mostrados son el volumen tumoral medio ± EEM (n = 8 por grupo). Los cuadrados vacíos corresponden al tratamiento con VE-822; los círculos rellenos de color negro son tratamientos con vehículo; los triángulos rellenos son el tratamiento con gemcitabina; los círculos vacíos y la línea discontinua son tratamiento con gemcitabina y VE-822 (10 mg/kg); los círculos rellenos de color gris y la línea discontinua son tratamiento con gemcitabina y VE-822 (30 mg/kg); los rombos rellenos de color negro son tratamiento con gemcitabina y VE-822 (60 mg/kg);

##### VE-822 actúa de manera sinérgica con compuestos quimiotóxicos en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón

El mapa de calor representa el cambio máximo en  $CI_{50}$  de cada compuesto quimiotóxico logrado cuando se combina con VE-822 durante 96 horas. Los colores representan un intervalo de cambio de  $CI_{50}$  de -10 (antagonismo, color gris claro) a 10 (sinergia, color gris oscuro) (véase la figura 1Y). VE-822 presenta una sinergia mayor que el triple con cisplatino, etopósido, gemcitabina, oxaplatino e irinotecán en líneas celulares de cáncer de pulmón (véase la figura 2Y).

5

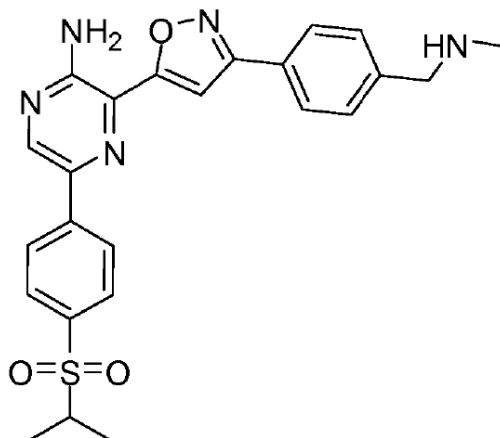
VE-822 actúa de manera sinérgica con cisplatino y gemcitabina en líneas celulares de cáncer de páncreas.

El mapa de calor representa el cambio máximo en  $CI_{50}$  de cada compuesto quimiotóxico logrado cuando se combina con VE-822 durante 96 horas. Los colores representan un intervalo de cambio de  $CI_{50}$  de -10 (antagonismo, color gris claro) a 10 (sinergia, color gris oscuro) (véase la figura 3Y).

10

**REIVINDICACIONES**

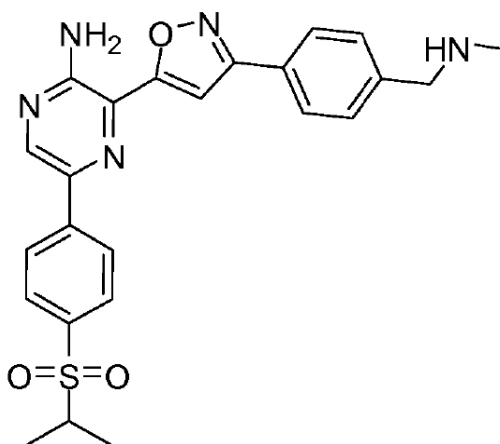
1. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

- 5 en combinación con otra terapia contra el cáncer seleccionada de gemcitabina, radioterapia y tanto gemcitabina como radioterapia juntas, para su uso en el tratamiento de cáncer de páncreas en un paciente.

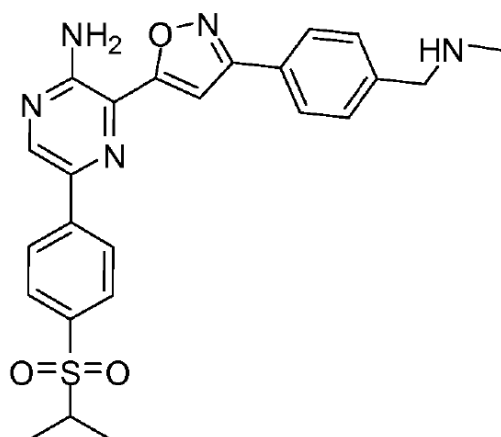
2. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

- 10 para su uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de ATR se combina con una terapia contra el cáncer seleccionada de gemcitabina y radioterapia, para su uso en el aumento de la sensibilidad de células de cáncer de páncreas a la terapia contra el cáncer en un paciente.

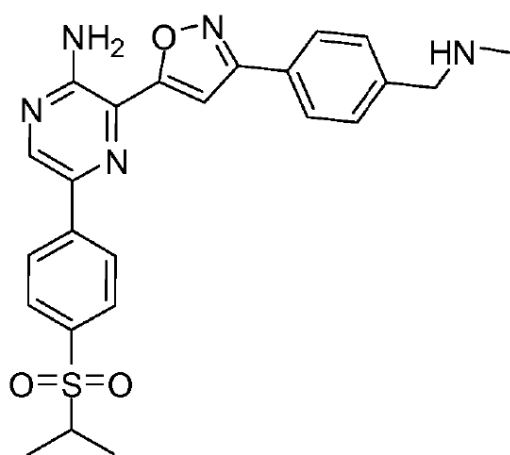
3. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

para su uso según la reivindicación 2, en el que las células de cáncer de páncreas son células de cáncer de páncreas hipóxicas.

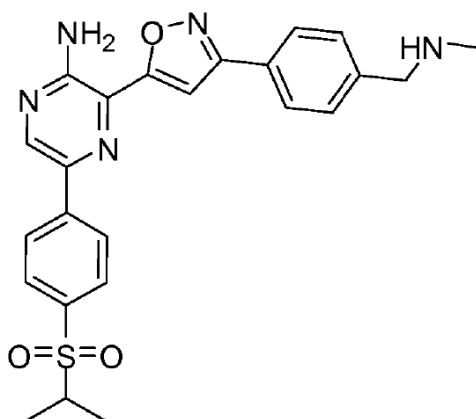
4. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

para su uso según la reivindicación 1 o 3, en el que la terapia contra el cáncer es radioterapia.

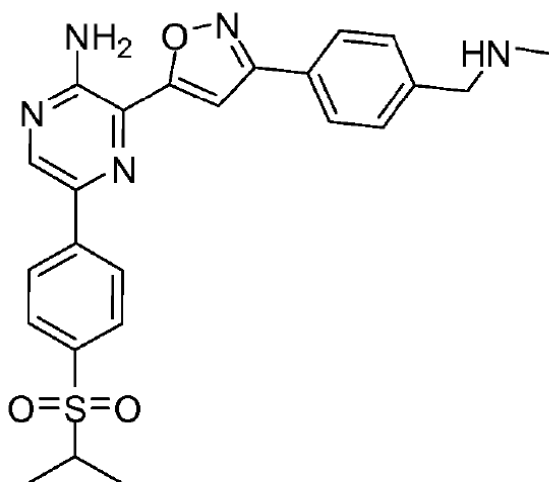
5. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

para su uso según la reivindicación 1 o 3, en el que la terapia contra el cáncer es gemcitabina.

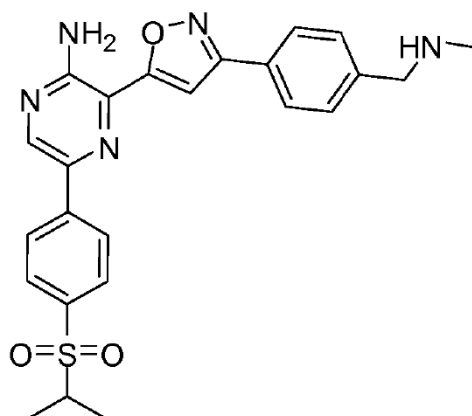
6. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

- 5 en combinación con quimiorradioterapia, en la que la quimiorradioterapia incluye tanto gemcitabina como radioterapia, para su uso según la reivindicación 1, para su uso en la sensibilización de células de cáncer de páncreas en un paciente a la quimiorradioterapia.

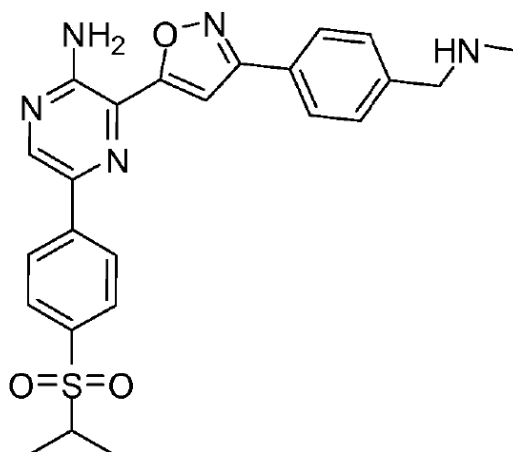
7. Un inhibidor de ATR de la fórmula:



822

en combinación con radioterapia, para uso según la reivindicación 1, para su uso en la alteración de puntos de control del ciclo celular inducidos por daño.

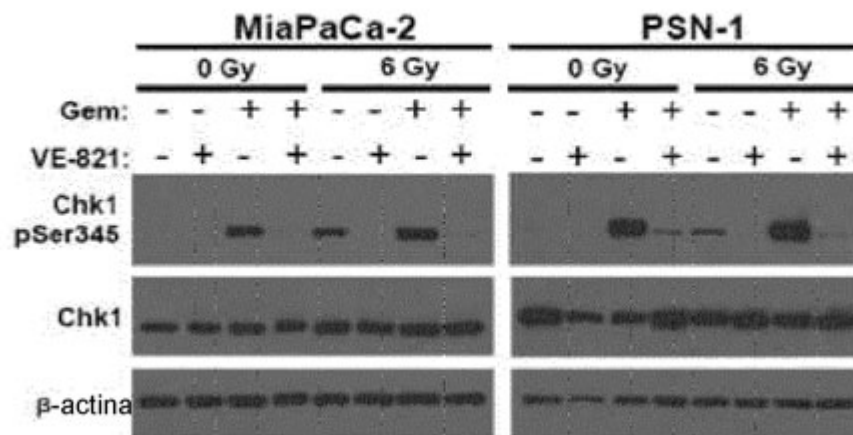
- 5 8. Un inhibidor de ATR de fórmula:



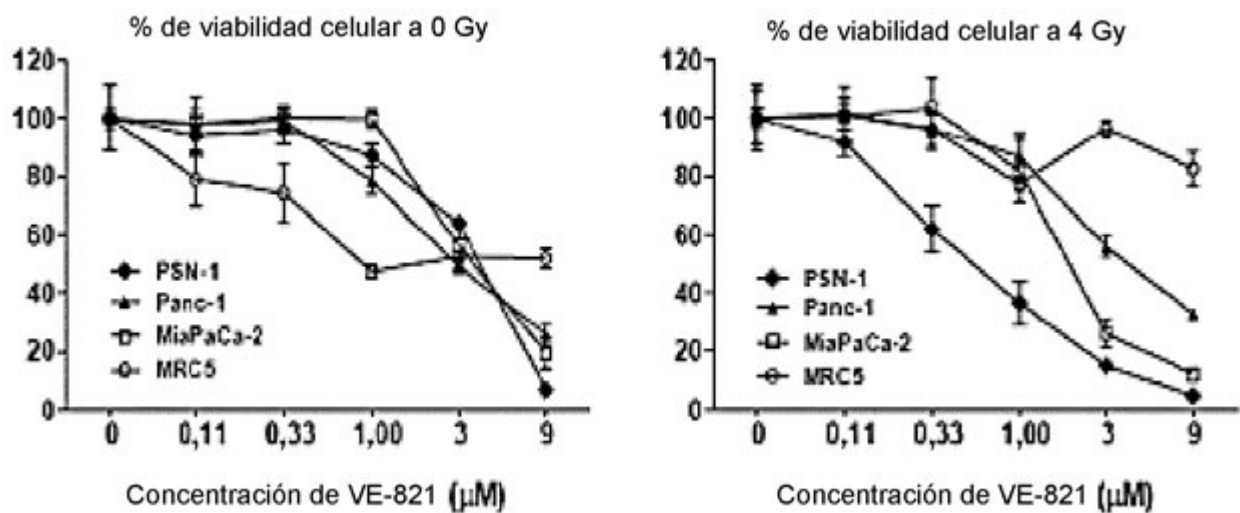
822

en combinación con tratamiento por radiación, para su uso según la reivindicación 1, para su uso en la inhibición de la reparación del daño del ADN mediante recombinación homóloga en una célula de cáncer de páncreas.

Figura 1  
A



B



C

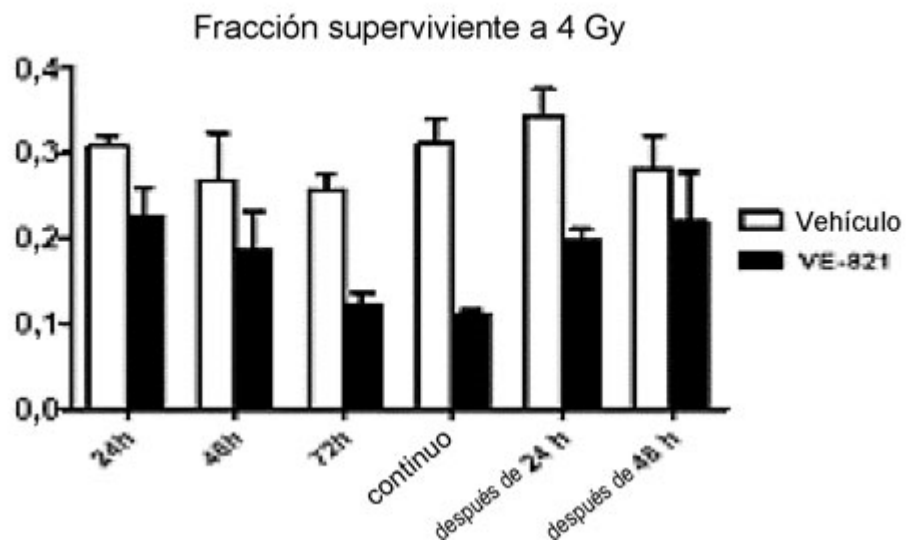


Figura 1

D

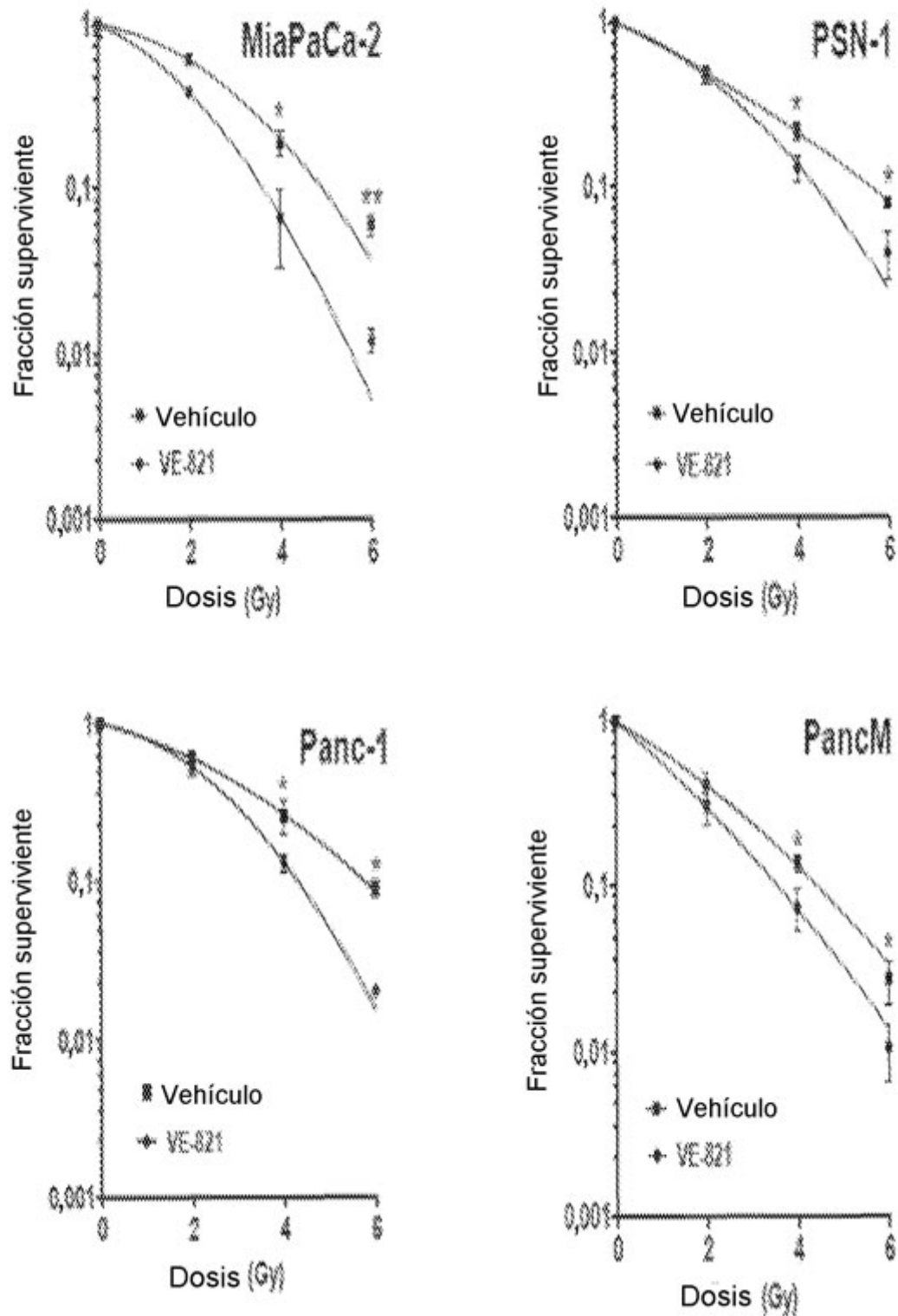


Figura 2

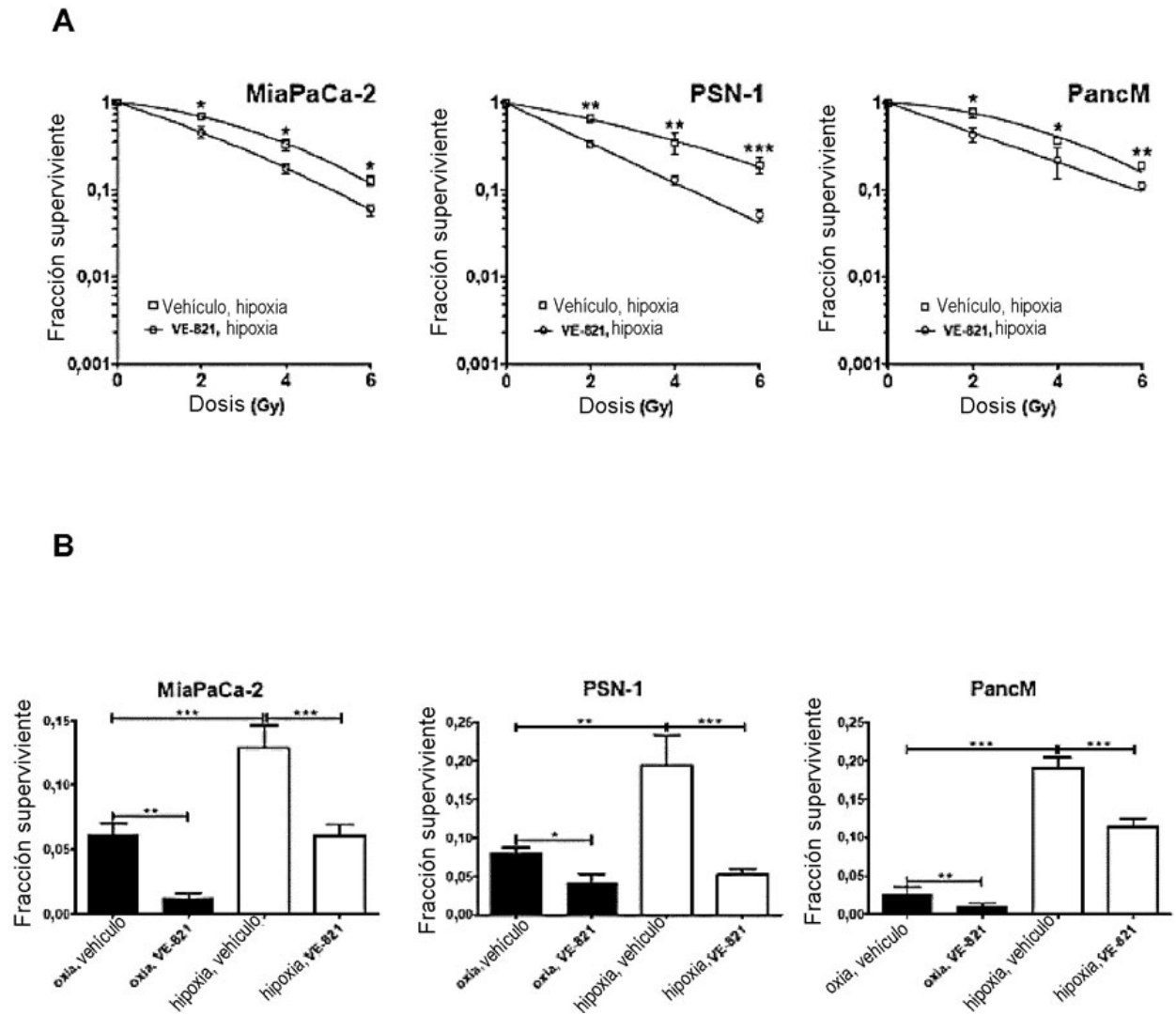
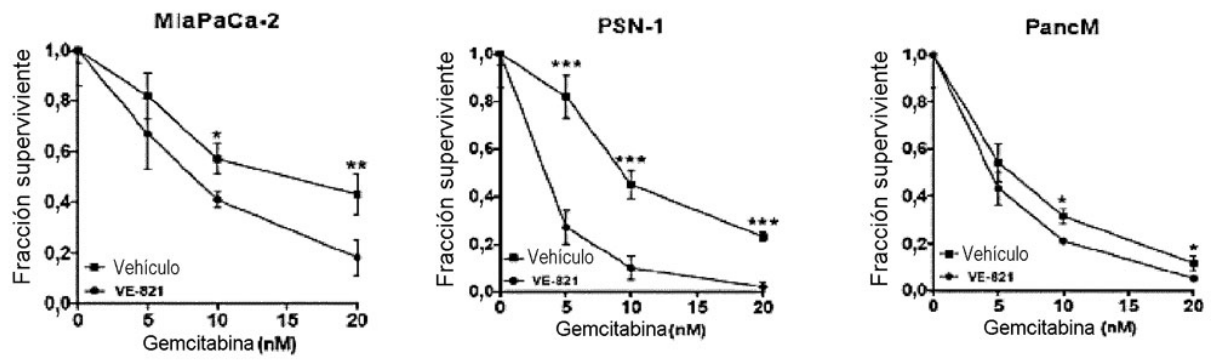


Figura 3

**A**



**B**

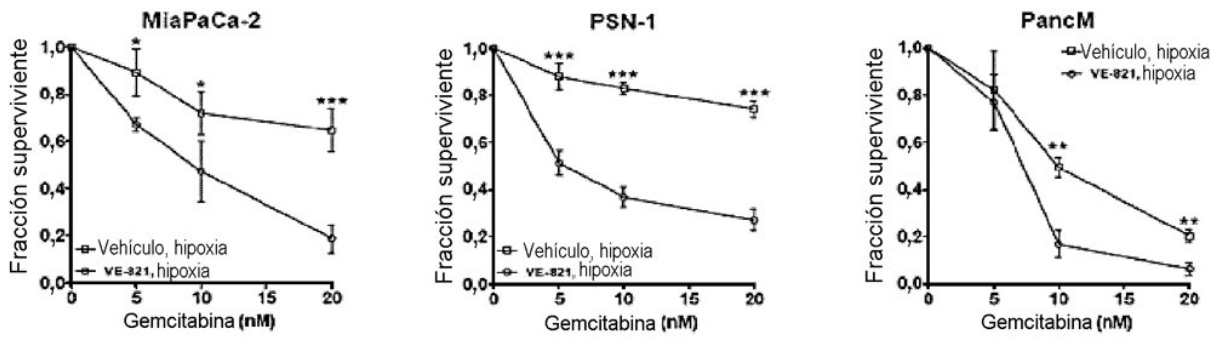
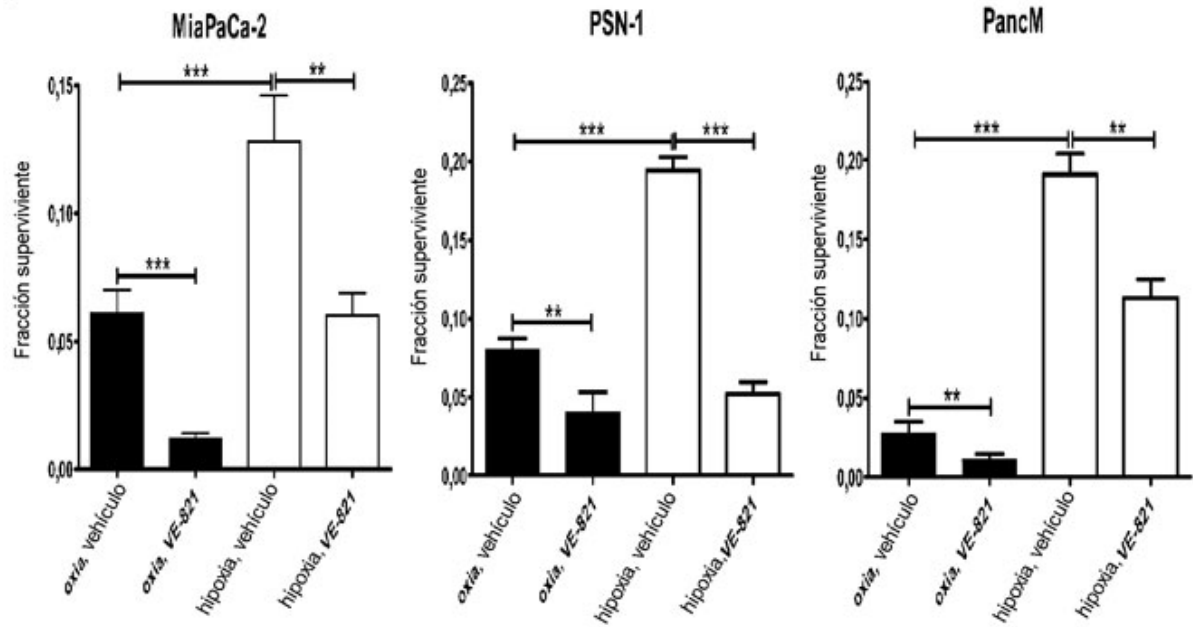


Figura 3

**C**



**D**

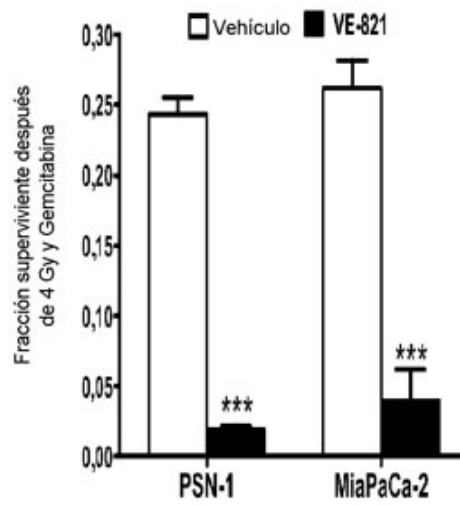


Figura 4

A

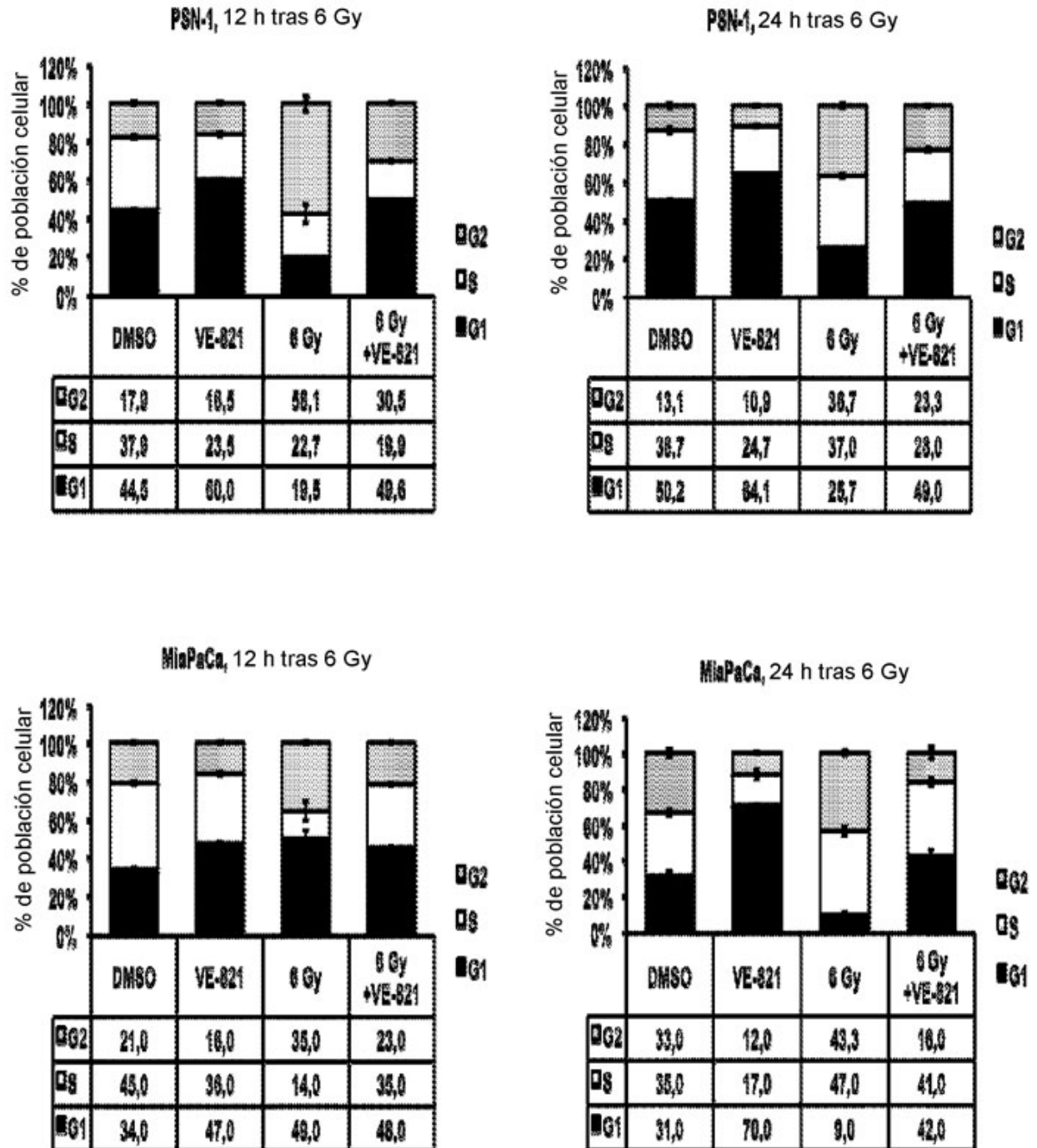
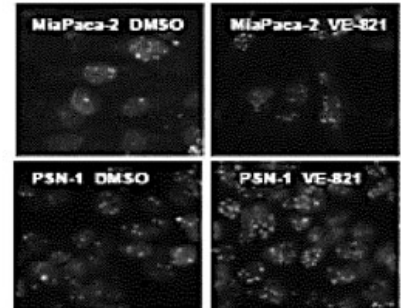
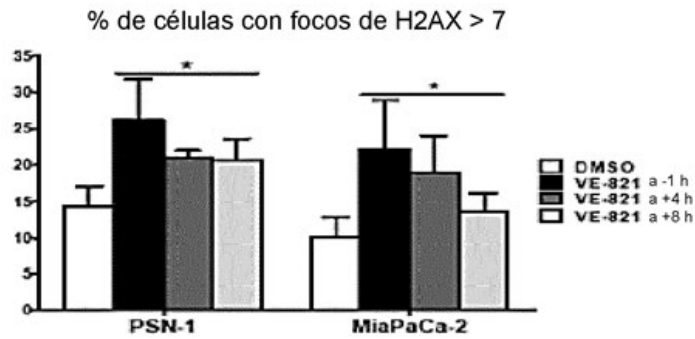
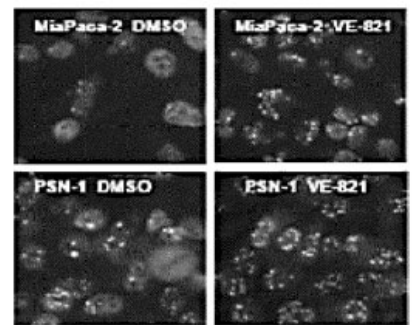
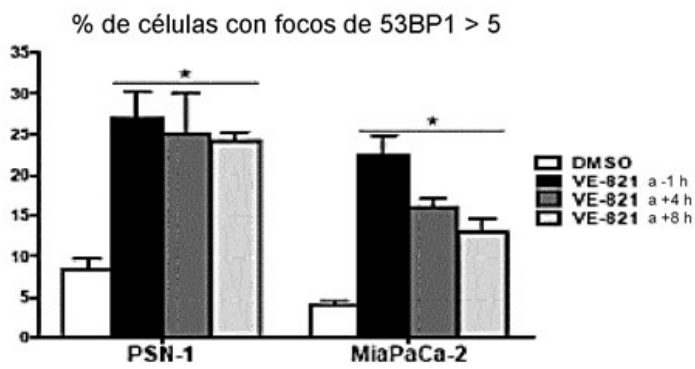


Figura 5  
A



B



C

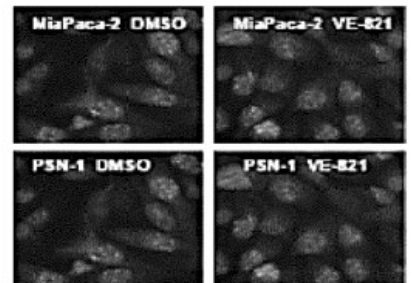
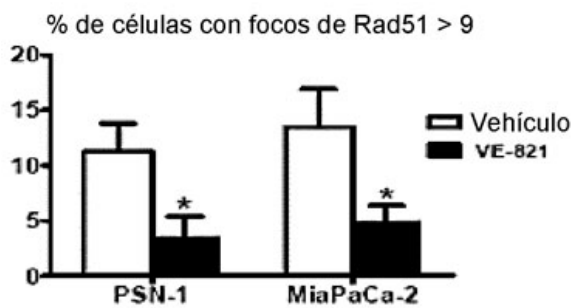


Figura 1 complementaria

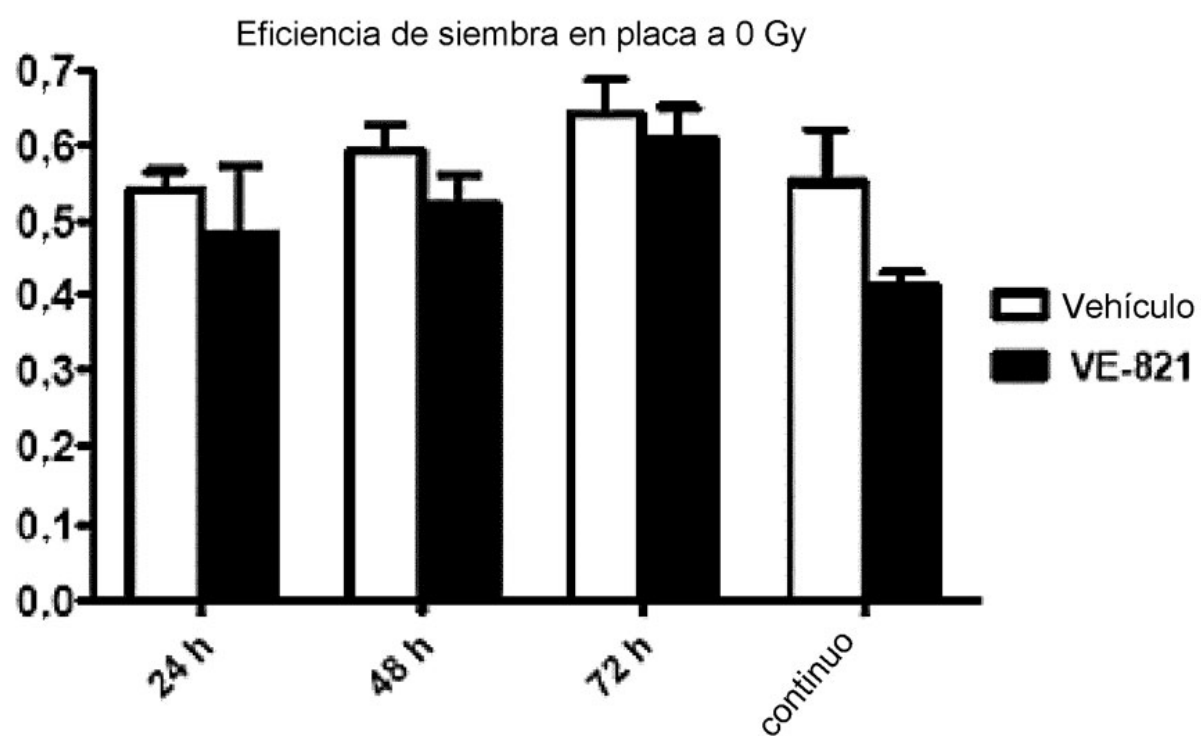


Figura 2 complementaria

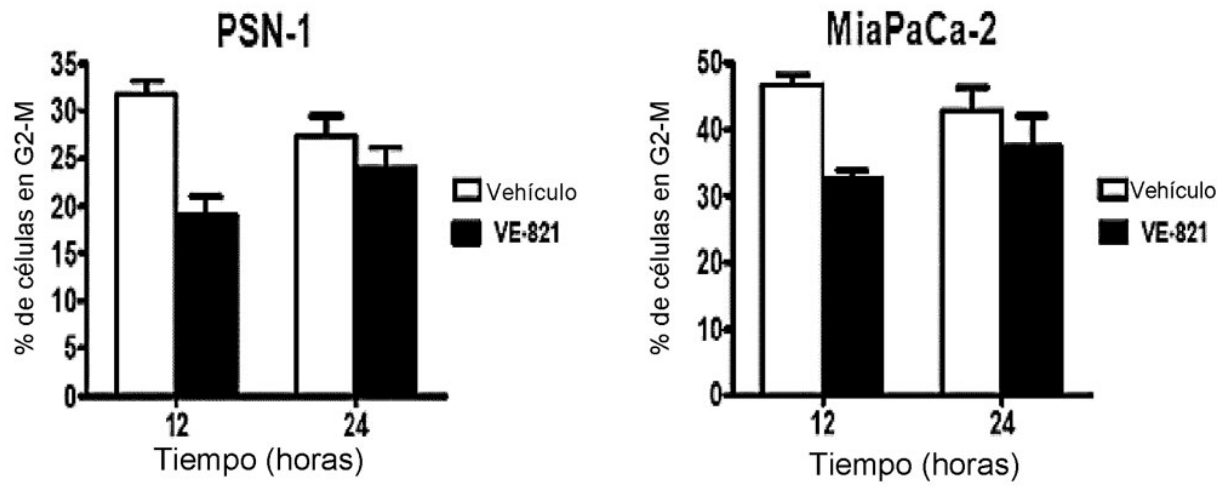


Figura 1X

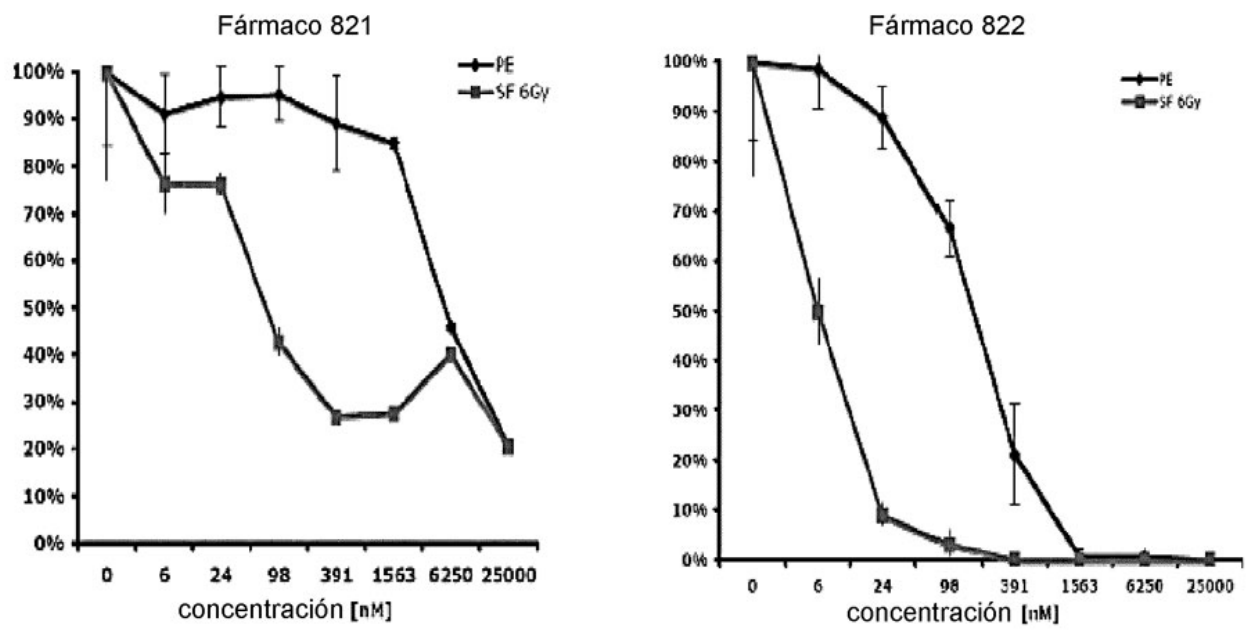


Figura 2X

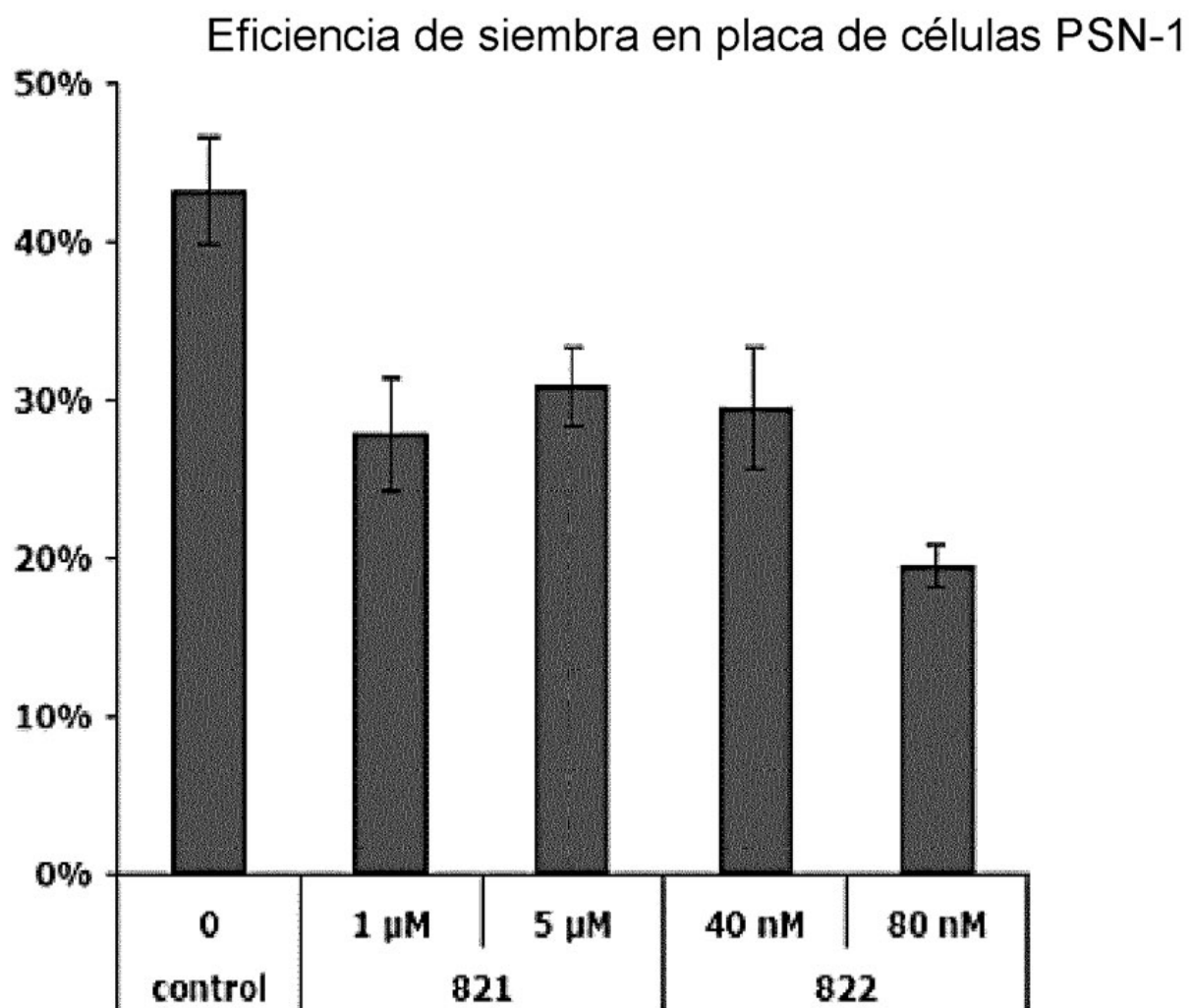
**A**

Figura 2X

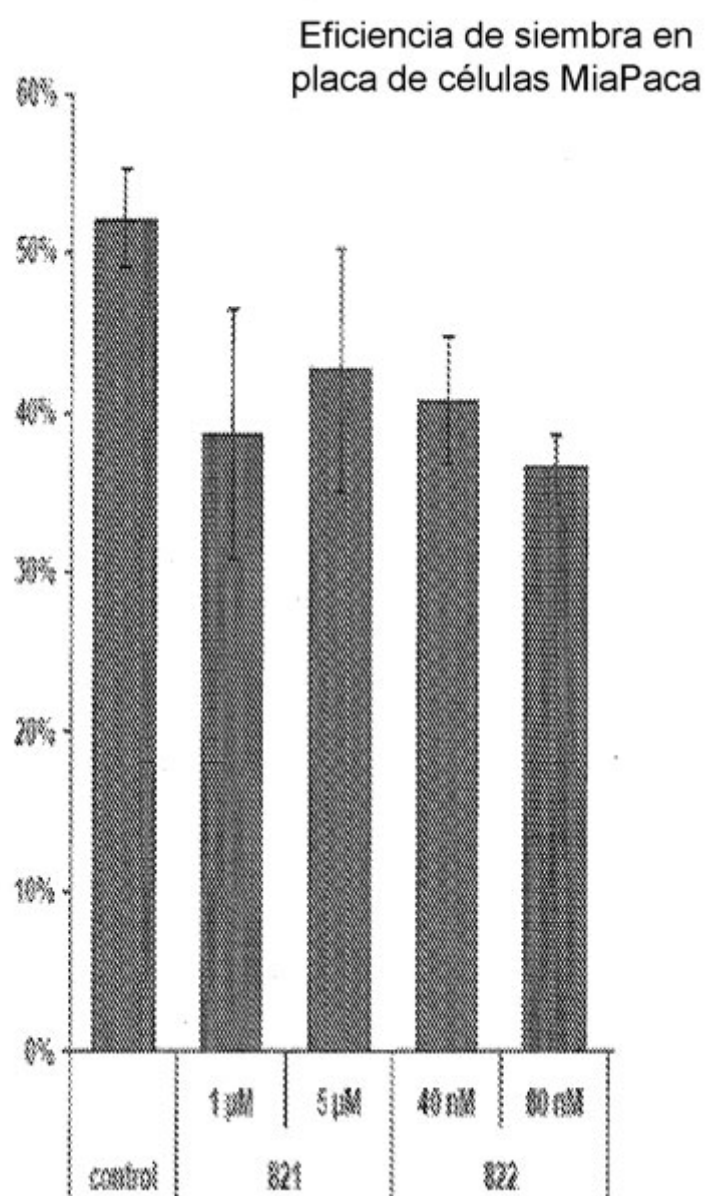
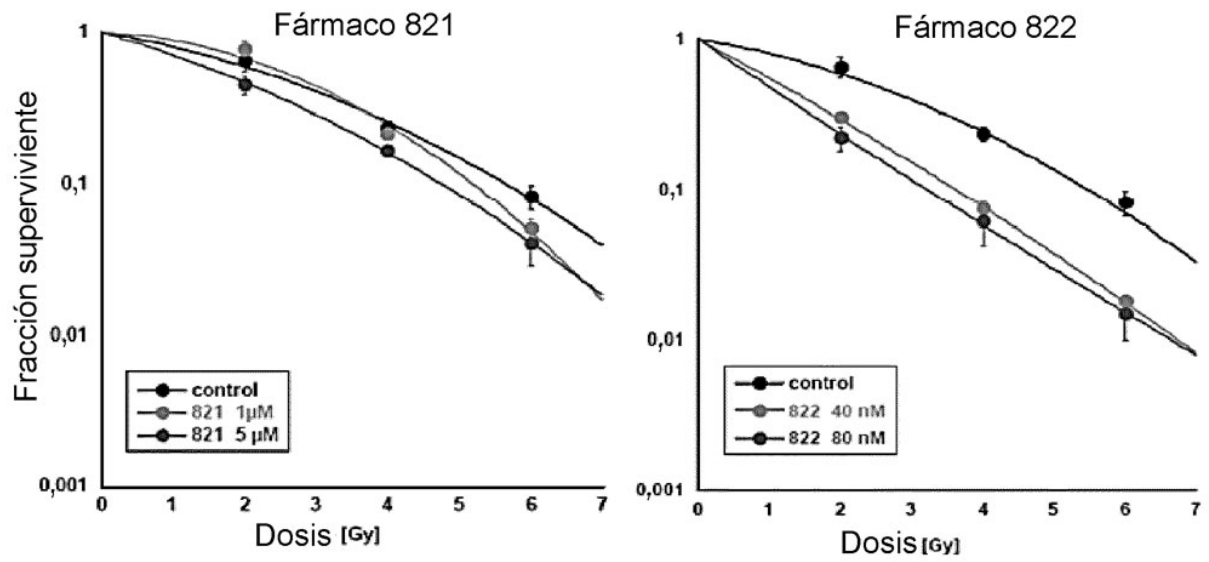
**A**

Figura 2X

**B**

**PSN1**



**B**

Figura 2X

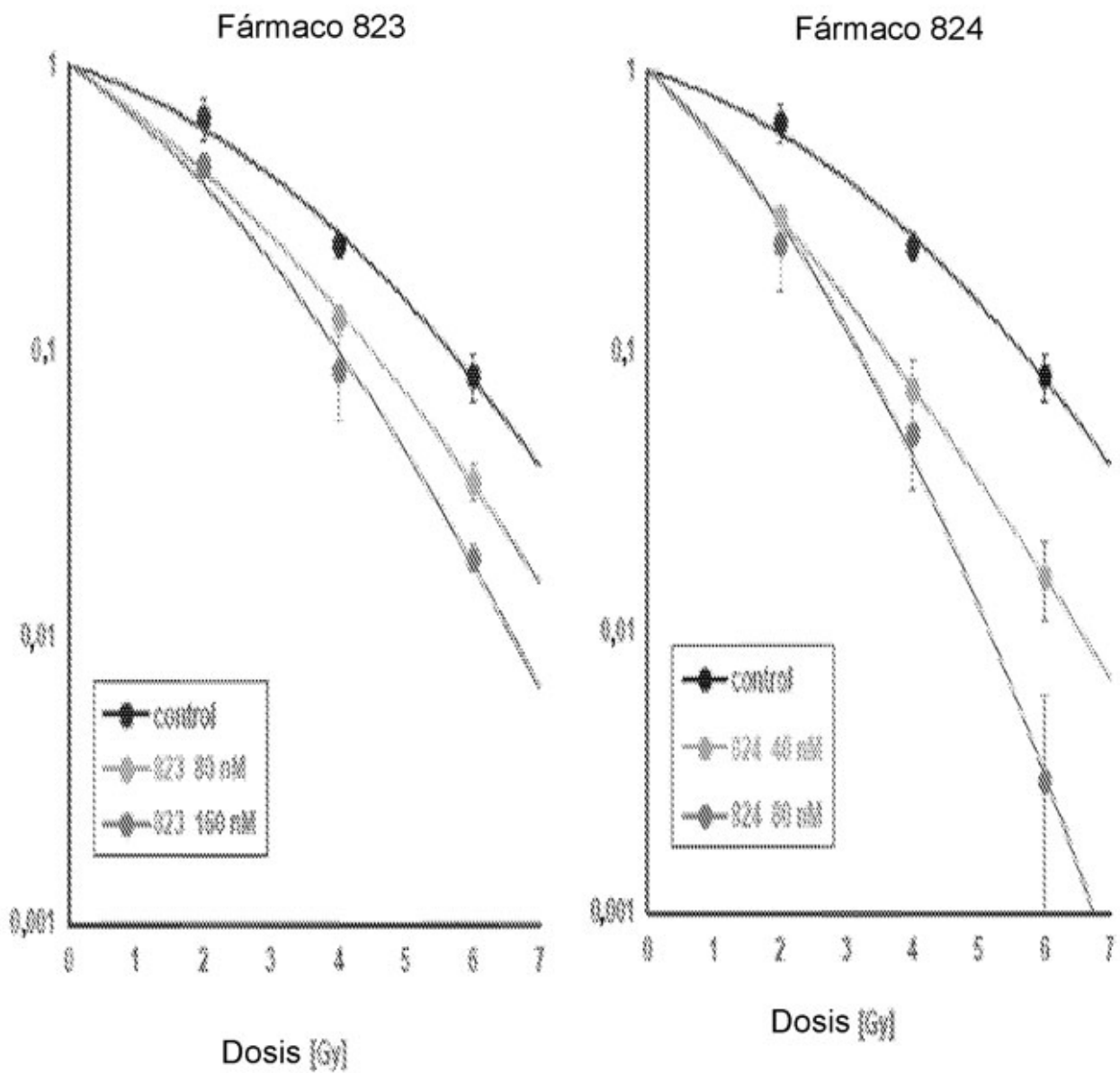
**PSN1**

Figura 2X

B

# MiaPaca

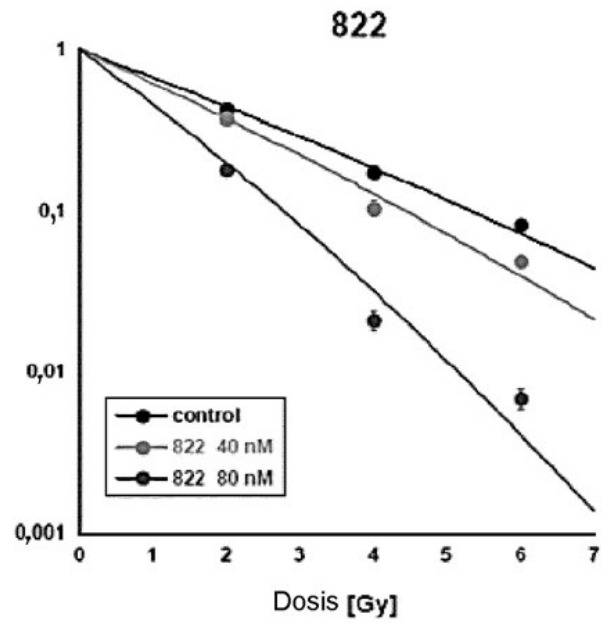
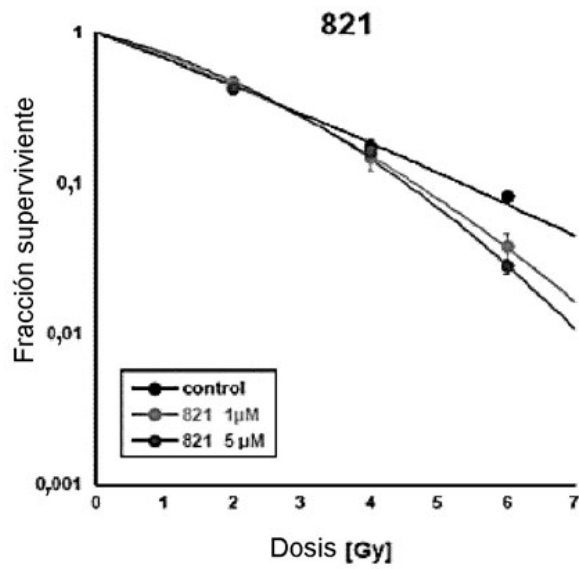


Figura 2X

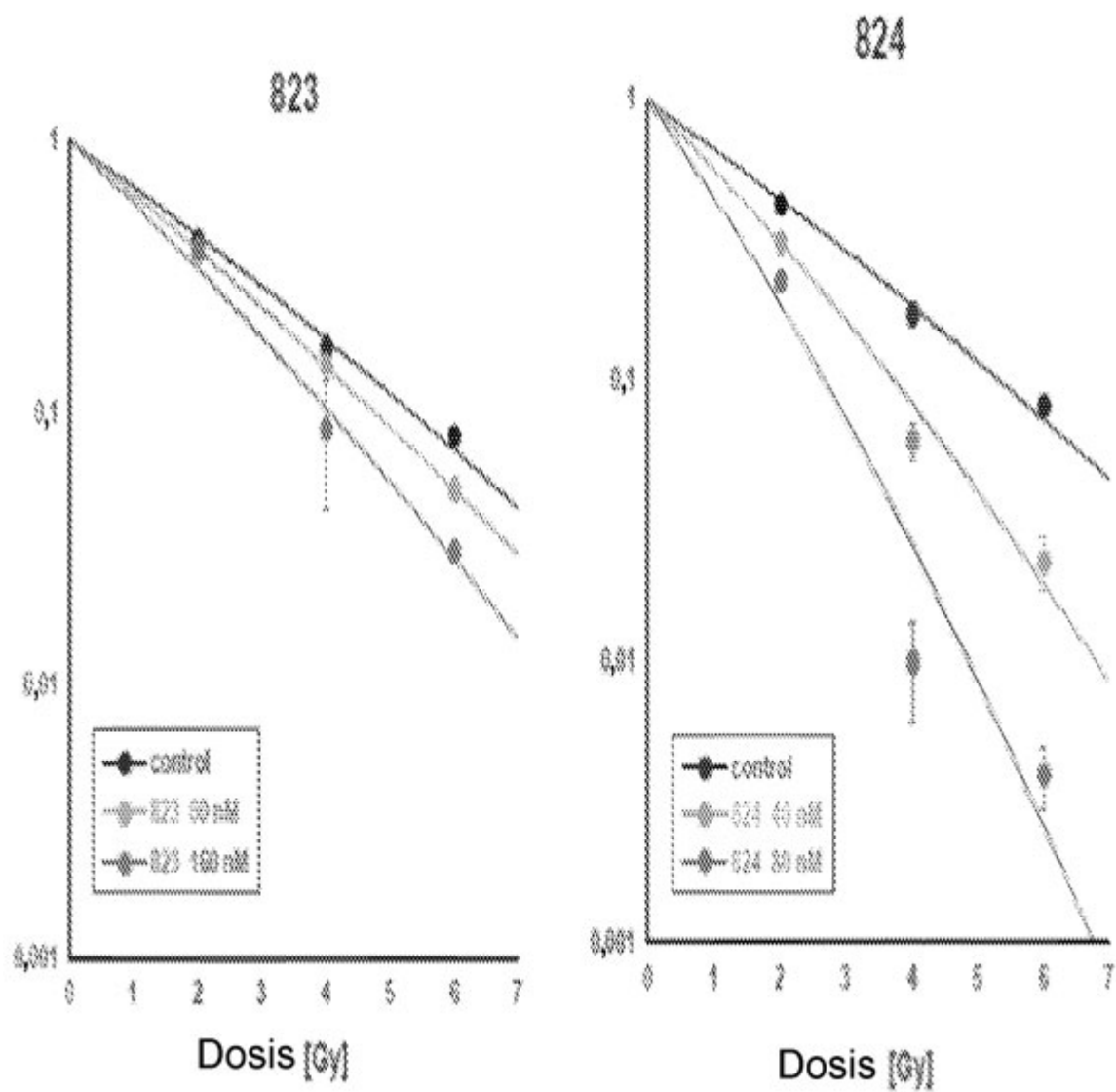
**B****MiaPaca**

Figura 2X

B

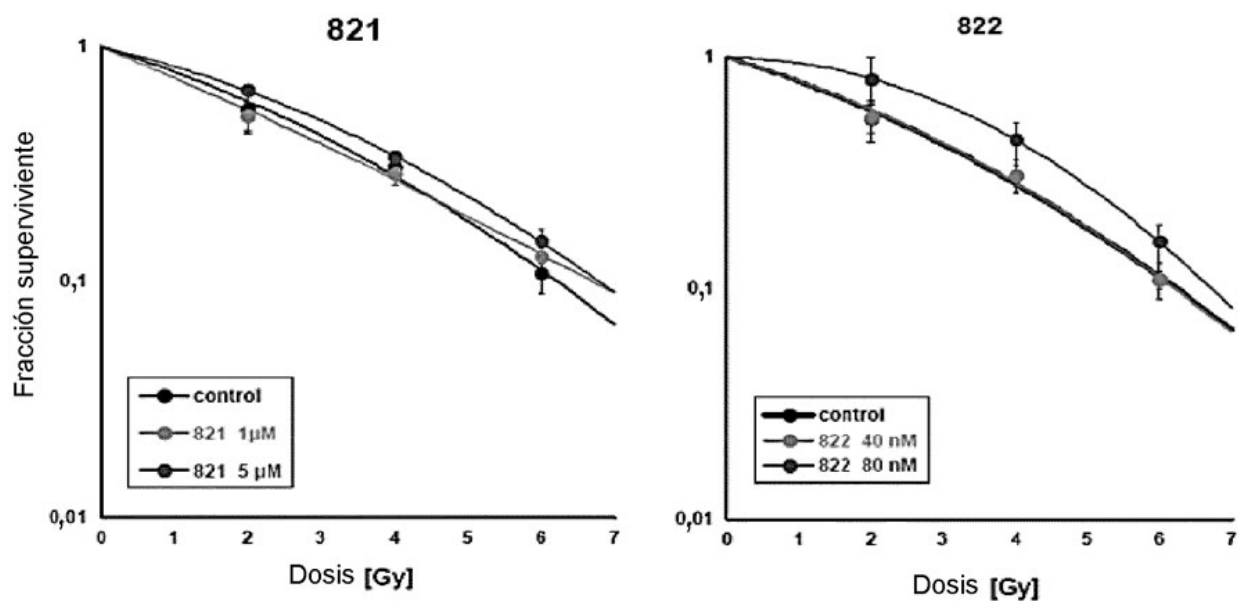
**MRC5**

Figura 2X

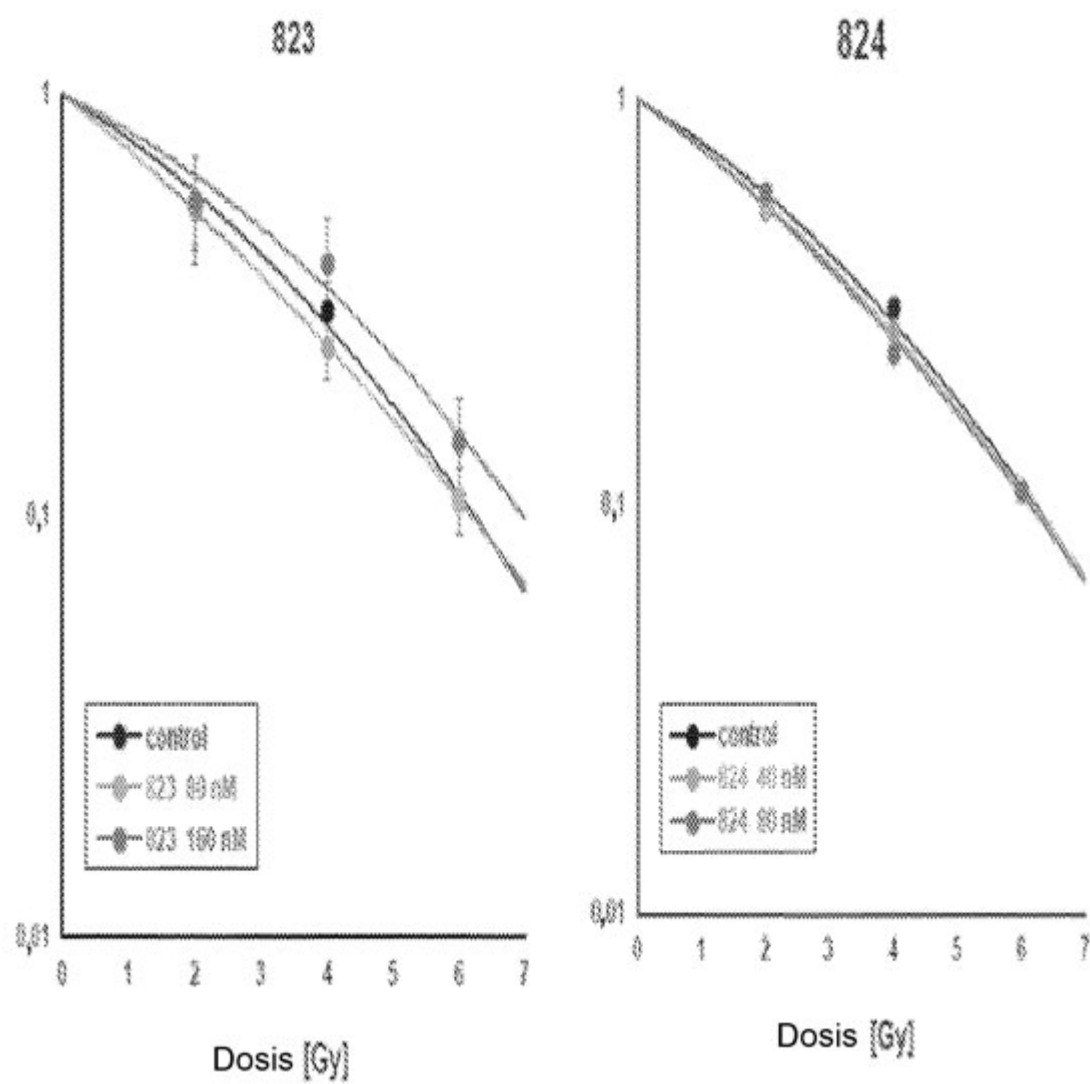
**B****MRC5**

Figura 3X

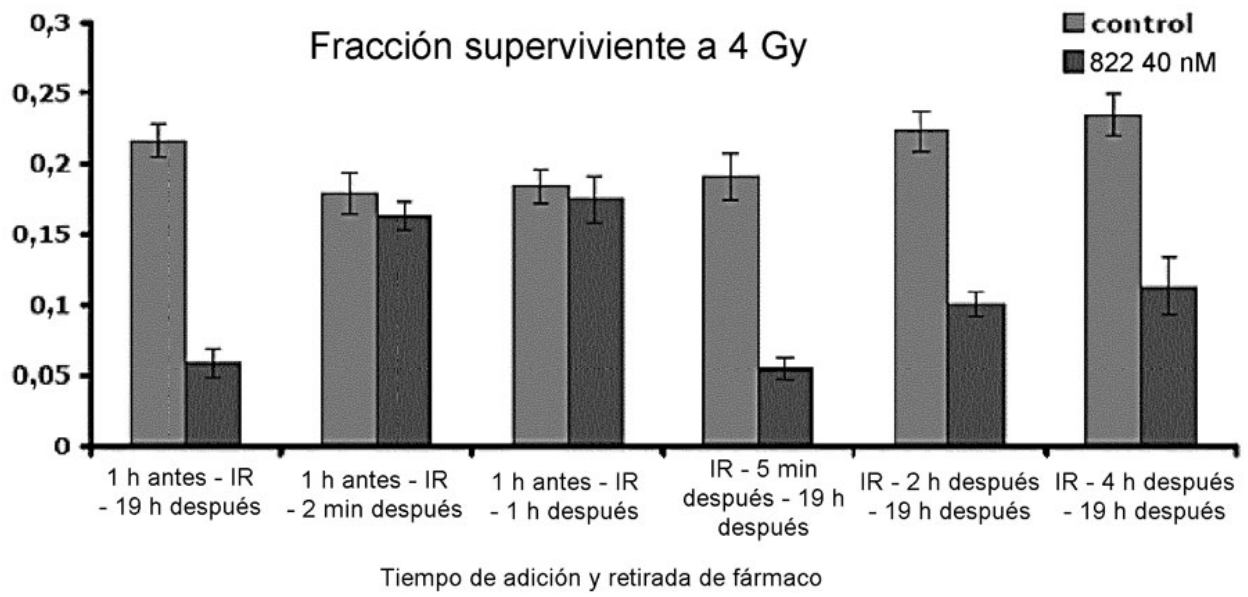


Figura 3X

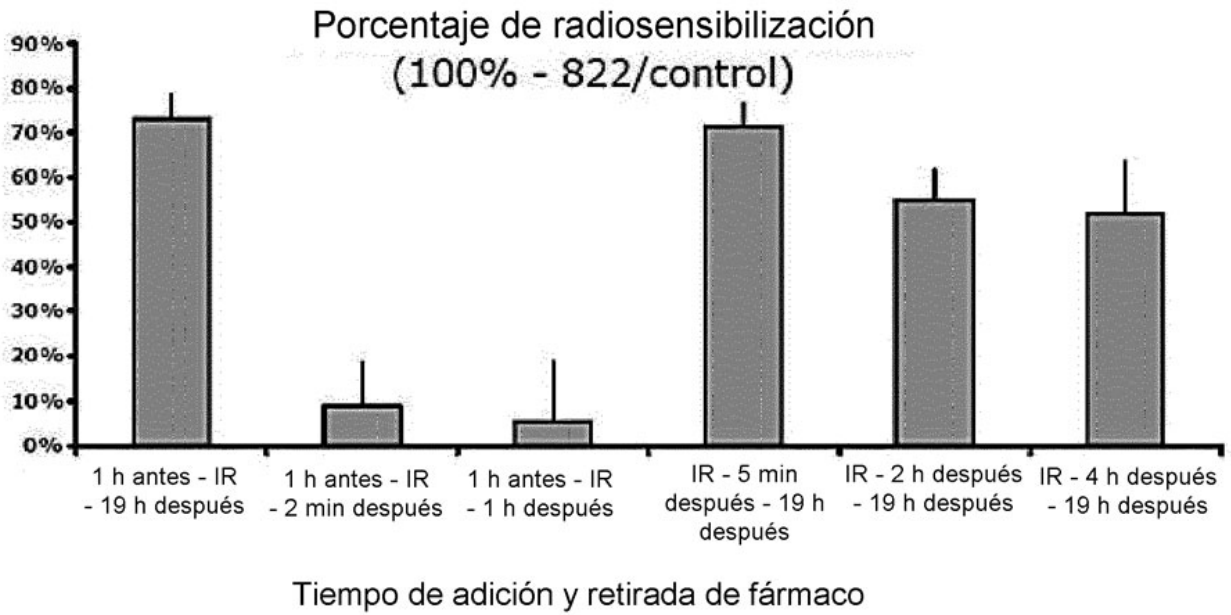


Figura 3X

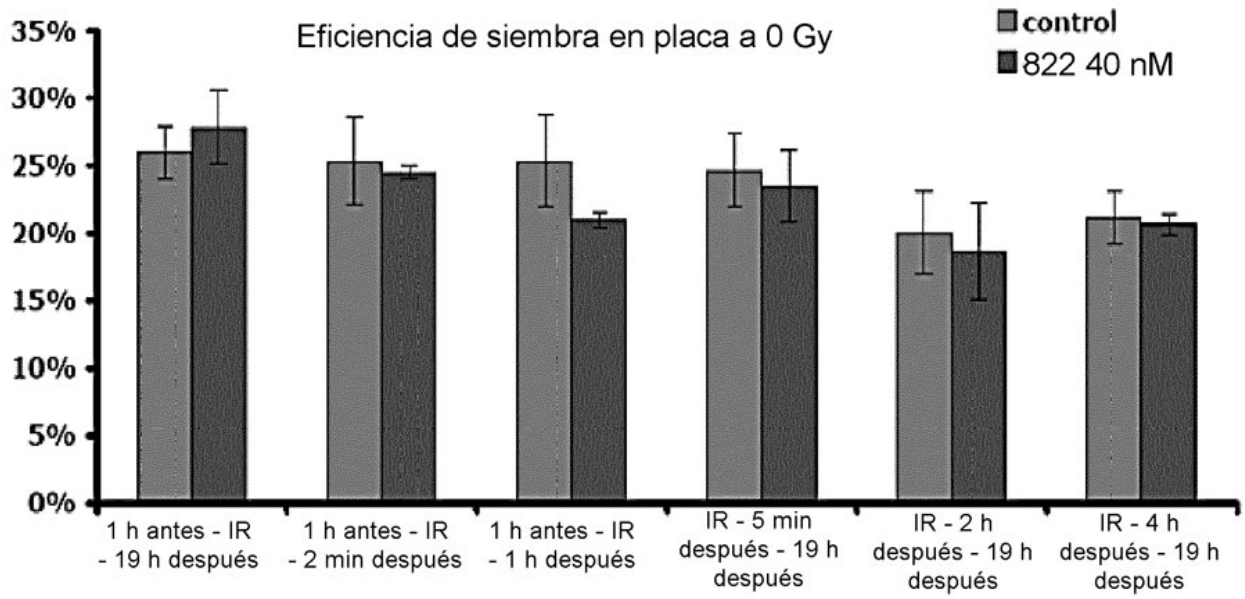


Figura 4X

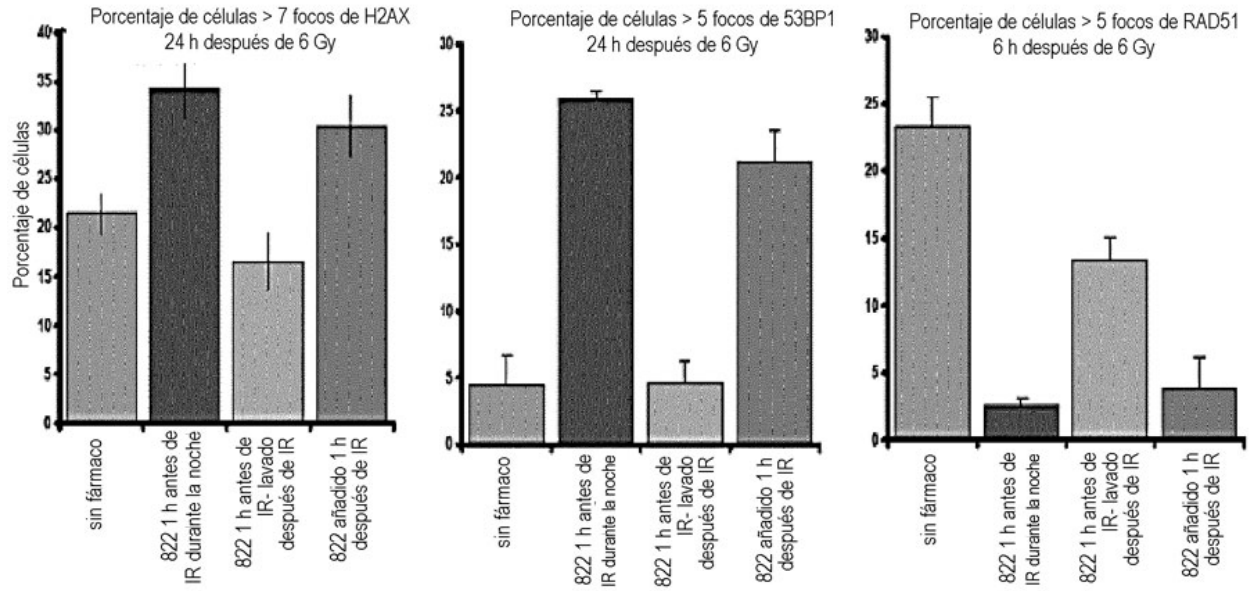


Figura 4X

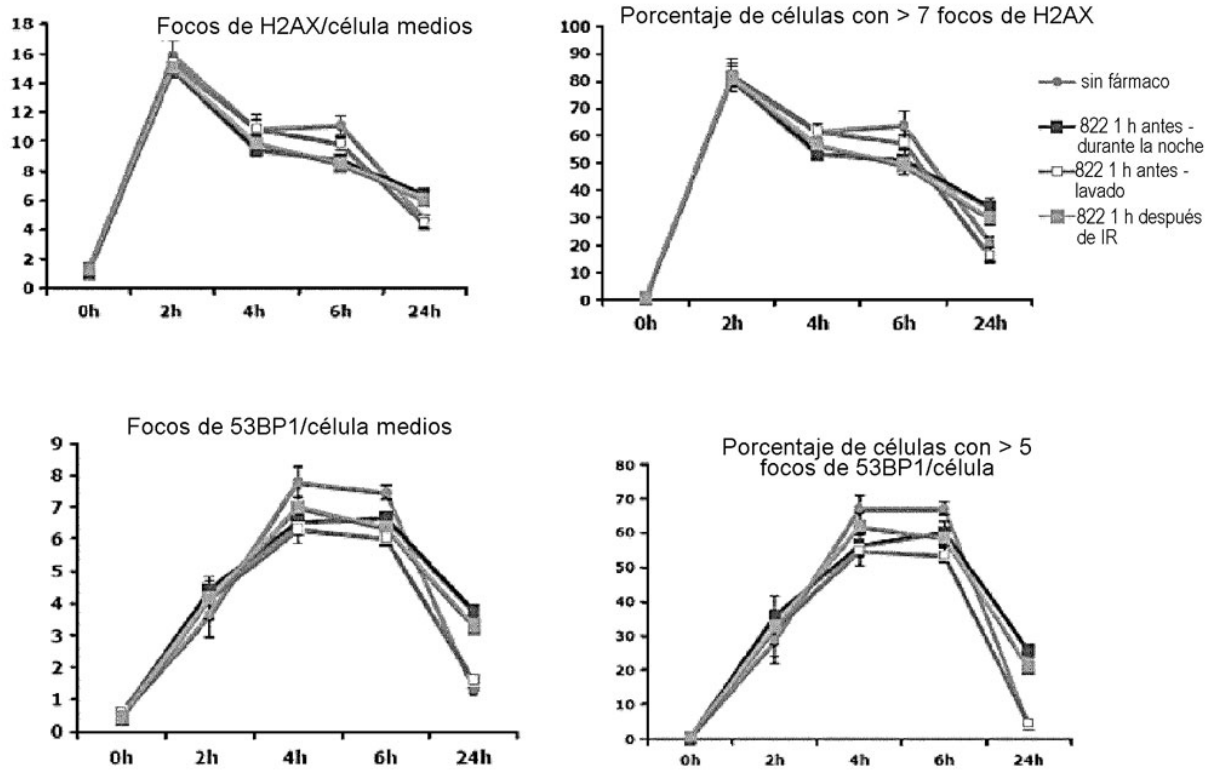


Figura 4X

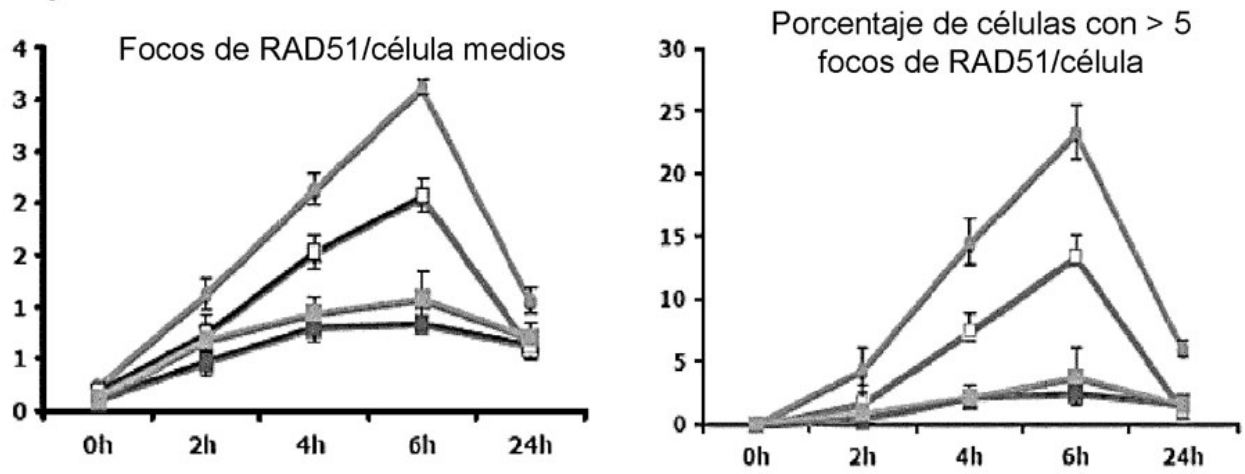


Figura 5X

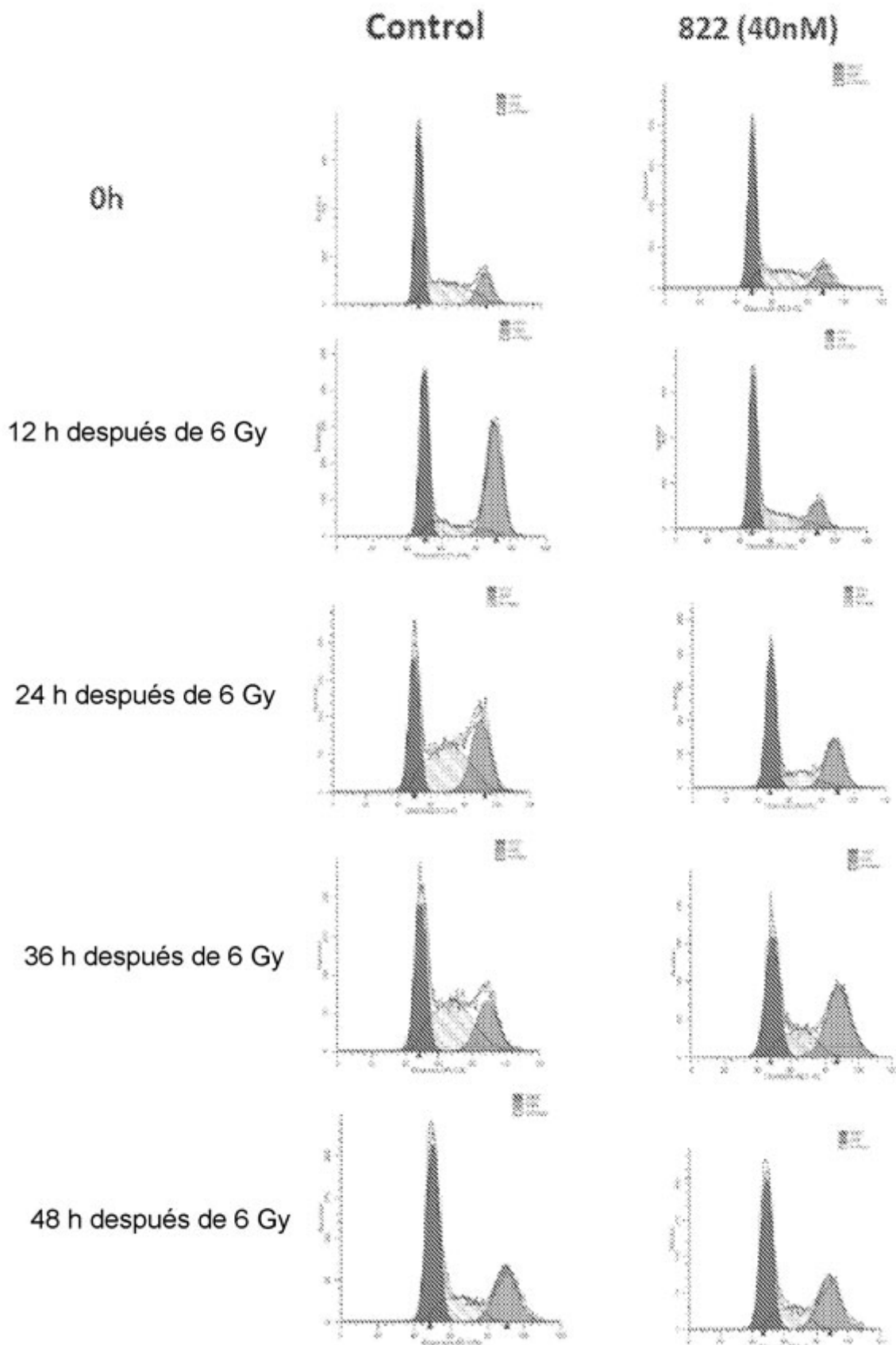


Figura 5X

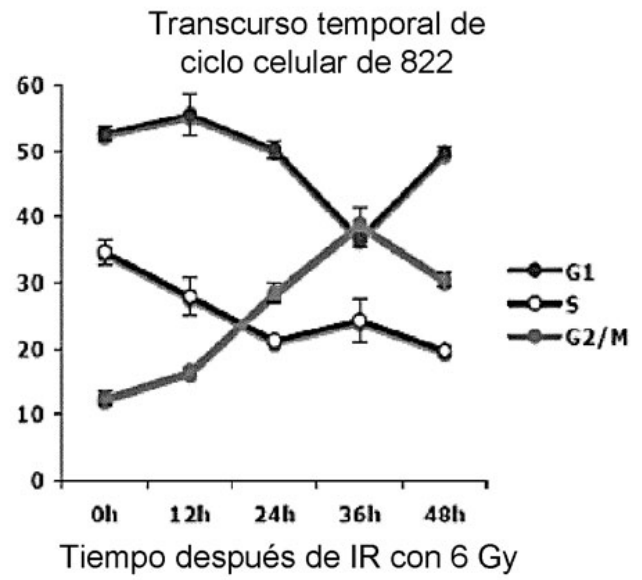
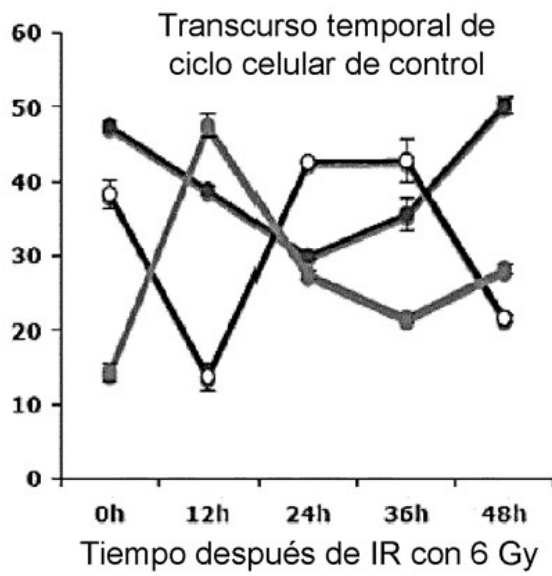


Figura 1Y

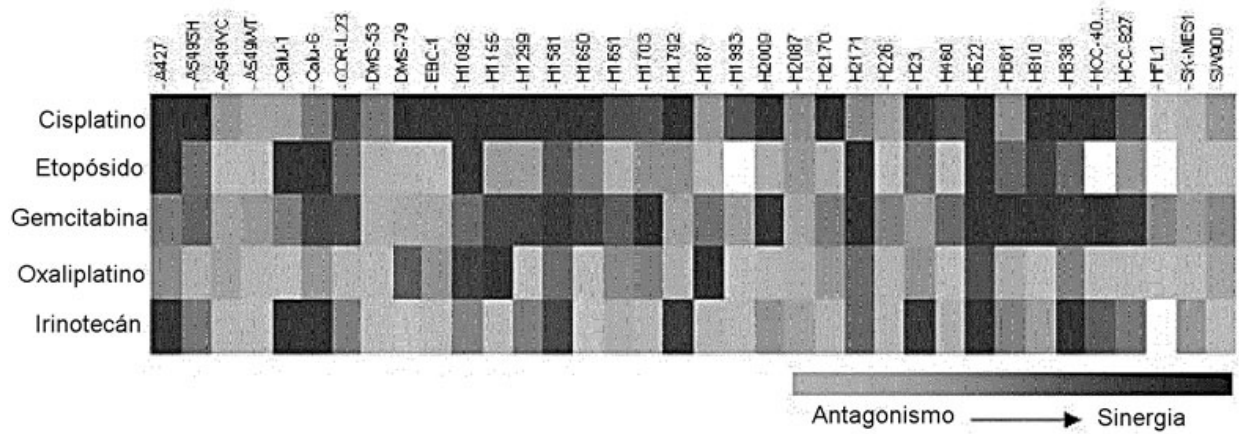


Figura 2Y

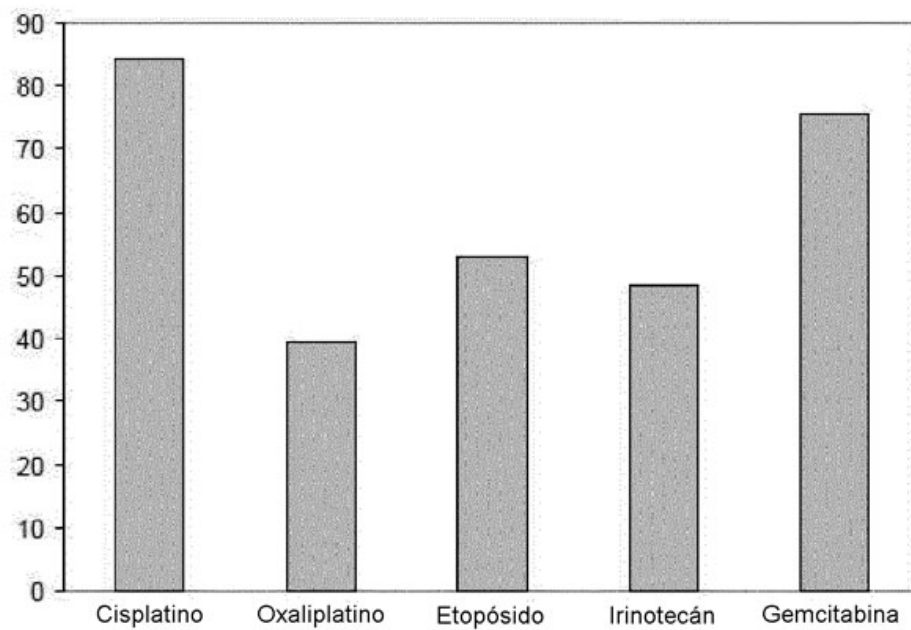


Figura 3Y

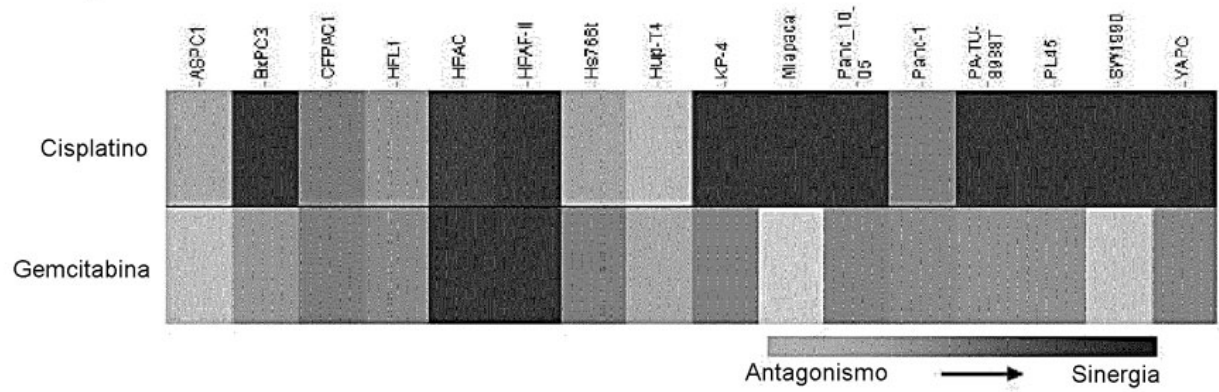


Figura 4Y

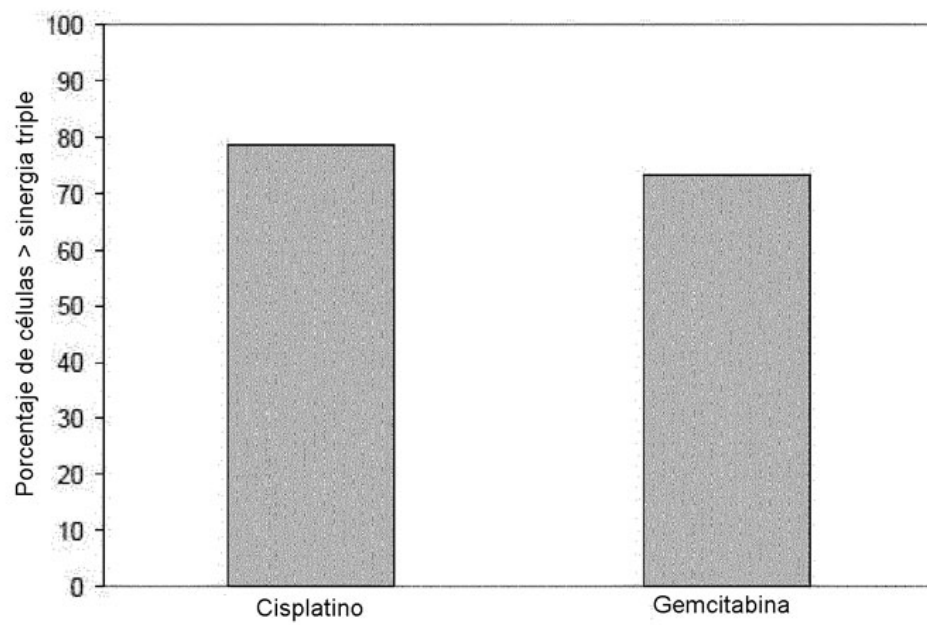


Figura 5Y

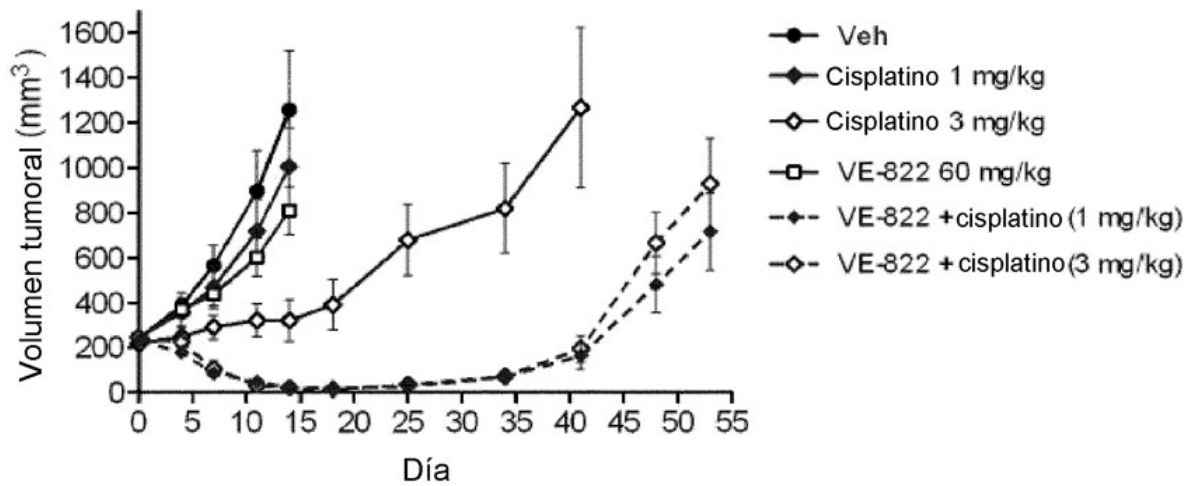


Figura 6Y

