

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
08 de enero de 2026 (08.01.2026)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
**WO 2026/008907 A1**

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 31/4035 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2025/070406

(22) Fecha de presentación internacional:

02 de julio de 2025 (02.07.2025)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202430551 02 de julio de 2024 (02.07.2024) ES

(71) Solicitantes: **FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE LA COMUNITAT VALENCIANA (FISABIO)** [ES/ES]; Avda. Catalunya, 21, 46020 Valencia (ES). **UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE** [ES/ES]; Avenida de la Universidad S/n., 03202 Elche (ES).

(72) Inventores: **DE JUAN ROMERO, Camino**; Avda. Catalunya, 21, 46020 Valencia (ES). **SACEDA SÁNCHEZ, Miguel**; Avda. Catalunya, 21, 46020 Valencia (ES). **FUENTES BAILE, María**; Avda. Catalunya, 21, 46020 Valencia (ES). **ARAUJO ABAD, Salomé**; Avda. Catalunya, 21, 46020 Valencia (ES). **ENCINAR HIDALGO, José Antonio**; Avenida de la Universidad S/n., 03202 Elche (ES). **GARCÍA MORALES, María Pilar**; Avenida de la Universidad S/n., 03202 Elche (ES). **PÉREZ VALENCIANO, Elizabeth**; Avenida de la Universidad S/n., 03202 Elche (ES). **FERNÁNDEZ ESCAMILLA, Ana María**; Avenida de la Universidad S/n., 03202 Elche (ES).

(74) Mandatario: **CALLE LÓPEZ, Alejandro**; Paseo Castellana, 150-4 dcha, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO,

JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UY, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: COMPOUNDS IDENTIFIED AS CDK4 INHIBITORS FOR USE AS MEDICATIONS

(54) Título: COMPUESTOS IDENTIFICADOS COMO INHIBIDORES DE CDK4 PARA USO COMO MEDICAMENTOS

(57) Abstract: The invention relates to compounds that have been identified as CDK4 (cyclin-dependent kinase enzyme) inhibitors for the first time, for use as a medication, in particular, for the treatment of cancers e.g. those with overexpression of the enzyme CDK4, and to pharmaceutical compositions comprising same. Said compounds target the interaction interface between CDK4 and its activating cyclin, whereas those drugs already approved for the treatment of cancers with overexpression of the enzyme CDK4 target the ATP-binding site.

(57) Resumen: La presente memoria se dirige a compuestos que se han identificado por primera vez como inhibidores de CDK4 (una enzima quinasa dependiente de ciclina) para su uso como medicamento, en particular para el tratamiento de cánceres, p.ej., en los que se sobreexpresa la enzima CDK4, y a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos. Dichos compuestos se dirigen a la interfase de interacción de CDK4 con su ciclina activadora, mientras que los fármacos hasta ahora aprobados para el tratamiento en los que se sobreexpresa la enzima CDK4, tienen como diana el sitio de unión a ATP.



WO 2026/008907 A1

**COMPUESTOS IDENTIFICADOS COMO INHIBIDORES DE CDK4 PARA USO COMO  
MEDICAMENTOS**

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

5           La presente memoria se dirige a compuestos que se han identificado por primera vez como inhibidores de CDK4, una enzima quinasa dependiente de ciclina, para su uso como medicamento y a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

10           La enzima quinasa dependiente de ciclina CDK4 es importante en la transición de etapas del ciclo celular, lo que la convierten en una diana terapéutica, para la que las agencias FDA y EMA han aprobado los fármacos palbociclib, ribociclib y abemaciclib, que van dirigidos al sitio de unión a ATP en la enzima. Sin embargo, dicho sitio de unión a ATP en la superfamilia de las quinasas está muy conservado entre distintas quinasas, y por lo tanto esta estrategia  
15           terapéutica puede ofrecer poca especificidad a CDK4.

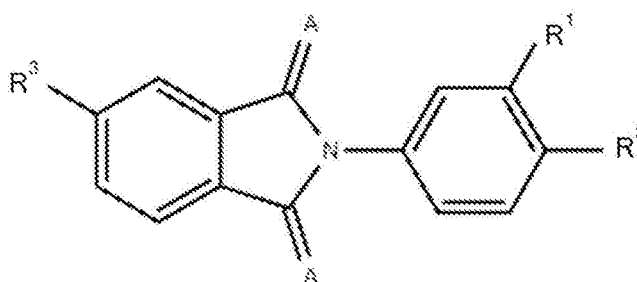
            La presente memoria identifica una familia de compuestos, tal y como se describe en detalle más adelante, que se unen a la CDK4 de forma distinta, en particular a la interfase de unión de CDK4 con su ciclina, es decir, la ciclina D1 (también referida como Cyc D1), ilustrado en la Figura 1. En particular se ha identificado que los compuestos de dicha familia se unirían  
20           con mayor afinidad a CDK4 que la ciclina D1 y por lo tanto bloquearían la unión de la Cyc D1 a CDK4 y evitarían la activación de CDK4 por dicha ciclina, actuando de esta manera como inhibidores selectivos de CDK4. Además, dicha familia de compuestos aportaría la ventaja de tener una mayor selectividad para CDK4 que otros tipos de inhibidores, como por ejemplo inhibidores dirigidos al sitio de unión a ATP.

25

**DESCRIPCIÓN GENERAL**

            La presente memoria se dirige a un compuesto cualquiera de estructura de acuerdo con la fórmula (I) para uso como medicamento:

30



35

Fórmula (I)

en donde

- A es un átomo independientemente seleccionado de entre O y S; preferentemente A es O o S; y más preferentemente A es O;
  - R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de entre H, -CONH-R<sup>a</sup>, arilo y alquilo, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> juntos forman un anillo;
  - R<sup>3</sup> se selecciona de entre -CONH-R<sup>b</sup>, arilo y alquilo;
- R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> seleccionándose independientemente de entre arilo y alquilo; y

los grupos arilo y alquilo y el anillo siendo opcionalmente sustituidos, preferentemente sustituidos por un grupo seleccionado de entre arilo, alquilo, halógeno, éter y amina, más preferentemente seleccionado de entre arilo, alquilo y halógeno, y todavía más preferentemente seleccionado de entre arilo y alquilo; y los grupos alquilo siendo lineares o ramificados.

Además, la presente memoria se dirige a formulaciones que comprenden dichos compuestos y en particular a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de estructura tal y como se define aquí arriba y se detalla más adelante y como mínimo un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente memoria también se dirige a métodos de administración del compuesto y de la composición farmacéutica.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

Figura 1.- Esquema de la enzima CDK4 con la diana de los inhibidores de la presente memoria interaccionado con su sustrato natural Cyc D1 y con uno de dichos inhibidores, resultando, respectivamente, en un complejo enzima-sustrato que activa la enzima (enzima activa) y en un complejo enzima-inhibidor que inactiva la enzima (enzima inactiva).

Figura 2.- Estructura de CDK4 (código del Protein Data Bank 6P8E) mostrando la superficie de proteína con un código de intensidad de color que indica la hidrofobicidad de los aminoácidos superficiales. El cubo superpuesto a la proteína indica el sitio de interacción con Cyc D1, mostrando una interfase CDK4/Cyc D1 altamente hidrofóbica donde también se unen los compuestos descritos en la presente memoria a CDK4.

Figura 3.- Efecto de en la proliferación celular de células HGUE-GB-39 tratadas con distintas concentraciones de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) y los inhibidores de CDK4

abemaciclib y palbociclib, representándose los porcentajes de células viables tras el tratamiento con los diferentes compuestos.

Figura 4A.- Porcentaje de células muertas obtenidas de la línea celular HGUE-GB-39 tratadas con el compuesto (Ia) y el inhibidor de CDK4 abemaciclib.

5        Figura 4B.- Efecto de los inhibidores de CDK4 abemaciclib y palbociclib comparado con el de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), todos ellos a una concentración 10  $\mu$ M, en la actividad enzimática de fosforilación del complejo CDK4-Cyc D1 recombinantes, sobre un péptido sintético obtenido de la proteína del retinoblastoma (sustrato natural de CDK4).

10        Figura 5.- Localización intracelular de las proteínas CDK4 y Cyc D1 por inmunofluorescencia para distintos tipos de células tumorales: HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480.

Figura 6.- Análisis de colocación de las proteínas CDK4 y Cyc D1 mediante la correlación de Pearson para distintos tipos de células: HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480 correspondientes a las fotografías de la Figura 5.

15        Figura 7A.- Interacción de las proteínas CDK4 y Cyc D1 con el compuesto (Ia). Ensayo de fluorescencia por ligadura de proximidad (PLA), donde los puntos fluorescentes son indicativos de la unión de las proteínas CDK4 y Cyc D1. Las imágenes muestran una disminución del número de puntos fruto de la disrupción de la unión causada por el compuesto (Ia) en comparación con la situación control donde se añadió solo el vehículo (DMSO). Se ha observado para distintos tipos de células: HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480.

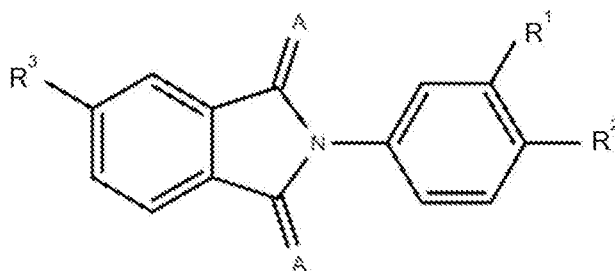
20        Figura 7B.- Interacción de las proteínas CDK4 y Cyc D1 con los compuestos (Ib y Ic). Ensayo de PLA, donde las imágenes muestran una disminución del número de puntos fruto de la disrupción de la unión causada por los compuestos (Ib y Ic) en comparación con la situación control donde se añadió solo el vehículo (DMSO). Se ha observado para distintos tipos de células de glioblastoma (GBM): HGUE-GB-39, HGUE-GB-42.

25        Figura 8.- Cuantificación de puntos de fluorescencia por PLA por célula en ausencia (control) y en presencia de los potenciales inhibidores. El compuesto (Ia) se ha ensayado en varios tipos celulares (HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480) correspondientes a varios tipos de tumores (GBM, páncreas y colon) mientras que los compuestos (Ic) y (Ib) sólo para células de GBM.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se ha identificado que compuestos de una estructura de acuerdo con la fórmula (I) se unen a la interfase de unión de CDK4 con Cyc D1, y por lo tanto pueden usarse como  
35        inhibidores de CDK4, gracias a lo cual serían útiles como medicamentos. Sin estar ligados a

ninguna teoría, los compuestos con una estructura de acuerdo con la fórmula (I) disponen de una combinación de anillos aromáticos, grupos hidrófobos y grupos aceptores de enlaces de hidrógeno que favorecería su unión en la interfase de unión de CDK4 con Cyc D1, ya que dicha interfase presenta una alta hidrofobicidad, tal y como se ilustra en la Figura 2. Por lo tanto, la presente memoria se dirige a compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I) para su uso como medicamento:



Fórmula (I)

en donde

- A es un átomo independientemente seleccionado de entre O y S; preferentemente A es O o S; y más preferentemente A es O;
- R¹ y R² se seleccionan independientemente de entre H, -CONH-R<sup>a</sup>, arilo y alquilo, o R¹ y R² juntos forman un anillo;
- R³ se selecciona de entre -CONH-R<sup>b</sup>, arilo y alquilo;

R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> seleccionándose independientemente de entre arilo y alquilo; y

los grupos arilo y alquilo y el anillo siendo opcionalmente sustituidos, preferentemente sustituidos por un grupo seleccionado de entre arilo, alquilo, halógeno, éter y amina más preferentemente seleccionado de entre arilo, alquilo y halógeno, y todavía más preferentemente seleccionado de entre arilo y alquilo; y los grupos alquilo siendo lineares o ramificados.

La presente memoria también se dirige a hidratos, o solvatos de dicho compuesto.

Como se puede apreciar de la estructura de la fórmula (I) la familia de compuestos definidos tiene grupos hidrófobos, notoriamente los anillos aromáticos ilustrados y también los grupos arilo y alquilo de los grupos sustituyentes R¹, R², R³, R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup>. Además, la estructura también incluye grupos aceptores de enlaces de hidrógeno, como los átomos A y los grupos -CONH- que también pueden estar presentes, y a su vez pueden actuar como grupos dadores de enlaces de hidrógeno. Sin estar ligados a ninguna teoría, la combinación de grupos hidrófobos y grupos aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno pueden favorecer la unión de esta familia de compuestos a la interfase entre CDK4 y Cyc D1, porque si bien la superficie de CDK4 en la interfase entre CDK4 y Cyc D1 se ha identificado como altamente hidrofóbica,

también puede contener grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, p.ej., presentes en los grupos funcionales de los aminoácidos situados en dicha superficie de CDK4, con los cuales los correspondientes grupos la familia de compuestos identificada puede interactuar favoreciendo su unión.

5 En particular, en la fórmula (I) A es un átomo independientemente seleccionado de entre O y S; preferentemente A es O o S; y más preferentemente A es O. Los átomos de oxígeno (O) y azufre (S) pueden actuar como grupos aceptores de enlaces de hidrógeno.

En la fórmula (I)  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente de entre H,  $-\text{CONH}-R^a$ , arilo y alquilo, o  $R^1$  y  $R^2$  juntos forman un anillo;  $R^3$  se selecciona de entre  $-\text{CONH}-R^b$ , arilo y alquilo;  $R^a$  y  $R^b$  seleccionándose independientemente de entre arilo y alquilo. Como se ha  
10 indicado anteriormente si bien los grupos  $-\text{CONH}-$  pueden actuar como aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno.

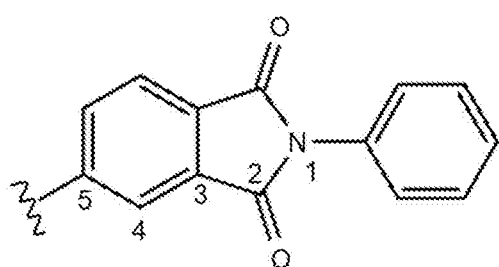
En la fórmula (I) los grupos arilo y alquilo y el anillo (si está presente formado por  $R^1$  y  $R^2$ ) pueden estar opcionalmente sustituidos. En ciertas ejecuciones de la invención pueden estar no sustituidos. En otras ejecuciones algunos pueden estar sustituidos y otros no. Si uno  
15 o más de entre los grupos arilo y alquilo y el anillo (formado por  $R^1$  y  $R^2$ ) están sustituidos, pueden estar preferentemente sustituidos por un grupo seleccionado de entre arilo, alquilo, halógeno, éter y amina, más preferentemente seleccionado de entre arilo, alquilo, y halógeno, y todavía más preferentemente seleccionado de entre arilo y alquilo.

20 A modo de ejemplo:

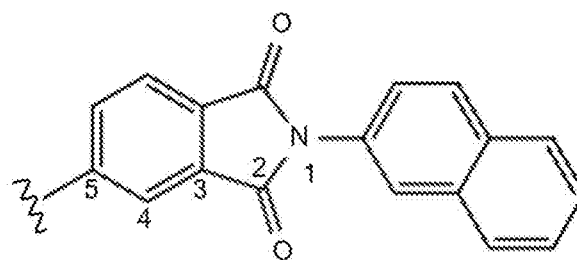
- los grupos arilo se pueden seleccionar de entre fenilo, ftalimidilo, bifenilo, naftalenilo, y bencilo;
- los grupos alquilo pueden ser lineares o ramificados y, particularmente, se pueden seleccionar de entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, y tert-butilo;
- 25 - un grupo halógeno se puede seleccionar de entre flúor, cloro, bromo y yodo
- un grupo éter puede incluir sustituyentes seleccionados de entre  $-\text{O}-R_i$  y  $-\text{R}_{ii}-\text{O}-R_i$ , en donde  $R_i$  y  $R_{ii}$  son independiente un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo tal y como se define más arriba; y
- un grupo amina puede incluir sustituyentes seleccionados de entre  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{R}_i-\text{NH}_2$ ,  
30  $-\text{NH}-\text{R}_{ii}$ ,  $-\text{R}_i-\text{NH}-\text{R}_{ii}$ ,  $-\text{N}(\text{R}_{ii})-\text{R}_{iii}$  y  $-\text{R}_i-\text{N}(\text{R}_{ii})-\text{R}_{iii}$ , en donde  $R_i$ ,  $R_{ii}$  y  $R_{iii}$  son independiente un grupo alquilo, preferiblemente un grupo alquilo tal y como se define más arriba.

Dichos grupos arilo o alquilo dentro de la fórmula (I) pueden ser los grupos arilo o alquilo de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^a$  y  $R^b$  o, si uno o más de estos grupos están sustituidos por un grupo  
35 arilo o alquilo, pueden ser los grupos de dicha sustitución.

A modo de ejemplo, si  $R^1$  es un grupo  $-\text{CONH}-R^a$  y  $R^a$  es un grupo arilo, como por ejemplo un grupo ftalimidilo, el grupo ftalimidilo puede estar sustituido por un grupo arilo como por ejemplo un grupo fenilo o naftalenilo, y dicho grupo fenilo o naftalenilo puede encontrarse, por ejemplo, en la posición N del grupo ftalimido. A modo más específico  $R^a$  puede ser un grupo N-fenilo-ftalimido o un grupo N-naftalenilo-ftalimido, preferiblemente un grupo N-fenilo-ftalimido. Más específicamente  $R^a$  puede ser un 5-(N-fenilo-ftalimido) o un 5-(N-naftalenilo-ftalimido), es decir un grupo N-fenilo-ftalimido o N-naftalenilo-ftalimido, unido en su posición 5, tal como se ilustra con las siguientes estructuras (IIa) y (IIb) respectivamente:

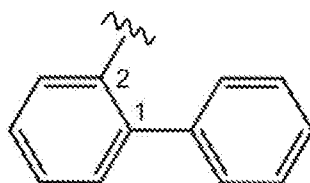


Estructura (IIa)



Estructura (IIb)

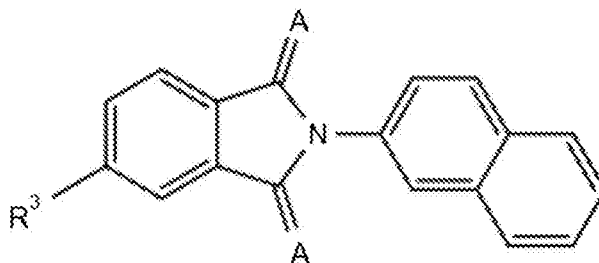
A modo de ejemplo, si  $R^2$  es un grupo  $-\text{CONH}-R^a$  y  $R^a$  es un grupo arilo, como por ejemplo un grupo fenilo, el grupo fenilo puede estar sustituido por un grupo arilo, como por ejemplo un segundo grupo fenilo, y dicho grupo fenilo puede encontrarse, por ejemplo, en la posición 2 del primer grupo fenilo. A modo más específico,  $R^a$  puede ser un bifenilo y todavía más específicamente puede ser un 2-(bifenilo), es decir un grupo bifenilo unido en su posición 2, tal y como se ilustra con la siguiente estructura (IIc):



Estructura (IIc)

A modo de ejemplo, si  $R^3$  es un grupo  $-\text{CONH}-R^b$ ,  $R^b$  puede ser un grupo arilo sustituido como se describe aquí arriba para  $R^a$ , y  $R^3$  puede ser por ejemplo un grupo N-fenilo-ftalimido o un grupo bifenilo como se describe también aquí arriba para  $R^1$  y  $R^2$ .

En algunas realizaciones, en la fórmula (I) los grupos  $R^1$  y  $R^2$  juntos pueden formar un anillo. Por ejemplo, el anillo formado puede ser un anillo aromático, preferentemente un anillo aromático seleccionado de entre anillo aromático de 6 miembros o de 5 miembros. A modo ilustrativo el anillo formado por  $R^1$  y  $R^2$  puede formar un conjunto aromático con el anillo aromático al que están unidos. Por ejemplo, un compuesto con una estructura de fórmula (I) en donde  $R^1$  y  $R^2$  juntos forman anillo de 6 miembros puede tener la siguiente estructura (IIId):



Estructura (IIId)

En algunas realizaciones en la fórmula (I)  $R^1$  y/o  $R^2$  puede ser  $-\text{CONH}-R^a$ . En algunas realizaciones particulares, preferentemente  $R^a$  puede ser arilo. Más preferentemente el arilo puede seleccionarse de entre fenilo, bifenilo, ftalimidilo, naftalenilo, bencilo. Opcionalmente el arilo puede estar sustituido con un grupo preferentemente seleccionado de entre fenilo, bencilo, naftalenilo, y etilo. Todavía más preferentemente el arilo puede seleccionarse de entre bifenilo, naftalenilo, N-fenilo-ftalimido y N-naftalenilo-ftalimido.

En algunas realizaciones particulares uno de entre  $R^1$  y  $R^2$  es H y el otro de entre  $R^1$  y  $R^2$  es  $-\text{CONH}-R^a$ .

En realizaciones más particulares, preferentemente:

- cuando  $R^1$  es H entonces  $R^2$  es  $-\text{CONH}-R^a$  y  $R^a$  se selecciona de entre bifenilo y naftalenilo; y preferentemente es bifenilo; o
- cuando  $R^2$  es H entonces  $R^1$  es  $-\text{CONH}-R^a$  y  $R^a$  se selecciona de entre N-fenilo-ftalimido y N-naftalenilo-ftalimido; y preferentemente es N-fenilo-ftalimido.

En algunas realizaciones, en la fórmula (I)  $R^3$  es  $\text{CONH}-R^b$ . En algunas realizaciones particulares, preferentemente  $R^b$  es arilo. Más preferentemente el arilo puede seleccionarse de entre fenilo, bifenilo, ftalimidilo, naftalenilo, bencilo. Opcionalmente el arilo puede estar



sustituido con un grupo preferentemente seleccionado de entre fenilo, bencilo, naftalenilo, y etilo. Todavía más preferentemente el arilo puede seleccionarse de entre bifenilo, naftalenilo, N-fenilo-ftalimido y N-naftalenilo-ftalimido; y todavía aún más preferentemente puede seleccionarse de entre bifenilo y N-fenilo-ftalimido.

5            En otras realizaciones, en la fórmula (I)  $R^3$  es arilo. En algunas realizaciones particulares, preferentemente el arilo puede seleccionarse de entre fenilo, bifenilo, ftalimidilo, naftalenilo, bencilo. Opcionalmente el arilo puede estar sustituido con un grupo preferentemente seleccionado de entre fenilo, bencilo, naftalenilo, y etilo. Todavía más preferentemente el arilo puede seleccionarse de entre bifenilo, naftalenilo, N-fenilo-ftalimido y  
10 N-naftalenilo-ftalimido; y todavía más preferentemente el arilo es N-naftalenilo-ftalimido.

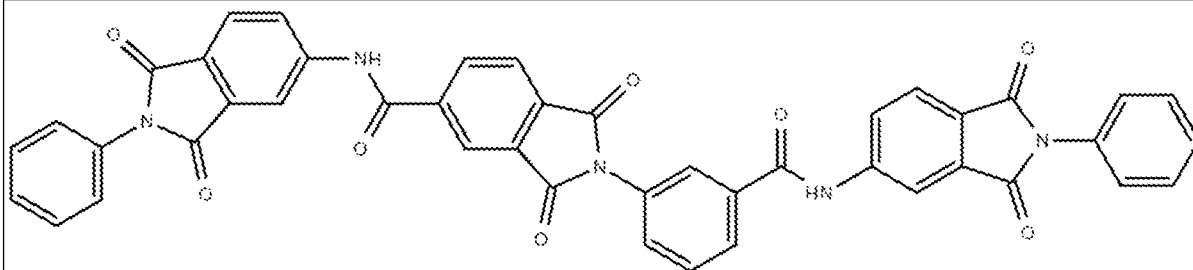
Compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I) pueden tener, preferiblemente, un peso molecular de 175 a 800 Da, en particular de 200 a 775 Da. Se ha observado que compuestos con pesos moleculares en estos rangos se unen a CDK4 y muestran actividad inhibitoria tanto *in vitro* como en sistema celulares, y por lo tanto tendrían la capacidad de  
15 penetrar las membranas plasmáticas.

Alternativamente o adicionalmente, compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I) pueden tener, preferiblemente, un logP de 1,0 a 10,0, en particular de 1,5 a 9,0. En realizaciones particulares el logP puede ser de 5,0 a 9,0, en particular de 6,0 a 8,5. Sorprendentemente, se ha observado que compuestos con log P dentro de este último rango  
20 muestran actividad en sistemas celulares a pesar de encontrarse fuera del rango de logP de menos de 5,0, considerado en el arte el logP más adecuado para usos farmacéuticos, por ejemplo, de acuerdo con la regla de cinco de Lipinsky.

El logP puede ser conocido, por ejemplo, del proveedor del compuesto, o se pueden determinar por métodos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, el log P de un  
25 compuesto puede determinarse mediante un software especializado, como, por ejemplo, Datawarrior 5.0 (Sander *et al.*, J. Chem. Inf. Model 2015, 55, 460-473, [DOI: 10.1021/ci500588j]). A modo de ejemplo, el compuesto (Ia) tiene un logP de 6,44, el compuesto (Ib) de 8,10 y el compuesto (Ic) de 7,37, determinado con Datawarrior 5.0.

El compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula (I) preferiblemente puede ser  
30 seleccionado de entre un compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula (Ia), la fórmula (Ib) y la fórmula (Ic), tal y como se detalla en la siguiente tabla. La tabla también incluye la notación SMILES y el nombre IUPAC en inglés de cada compuesto:

Compuesto (Ia)

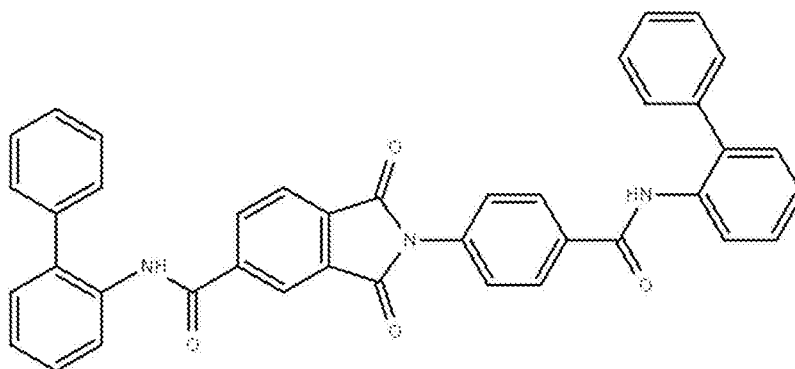


Fórmula (Ia)

O=C(C1C=C2C(C(N(C3C=C(C(NC4C=C5C(C(N(C6C=CC=CC=6)C5=O)=O)=CC=4)=O)C=CC=3)C2=O)=O)=CC=1)NC1C=C2C(C(N(C3C=CC=CC=3)C2=O)=O)=CC=1

N-(1,3-dioxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-yl)-2-{3-[(1,3-dioxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-isoindol-5-yl)carbamoyl]phenyl}-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindole-5-carboxamide

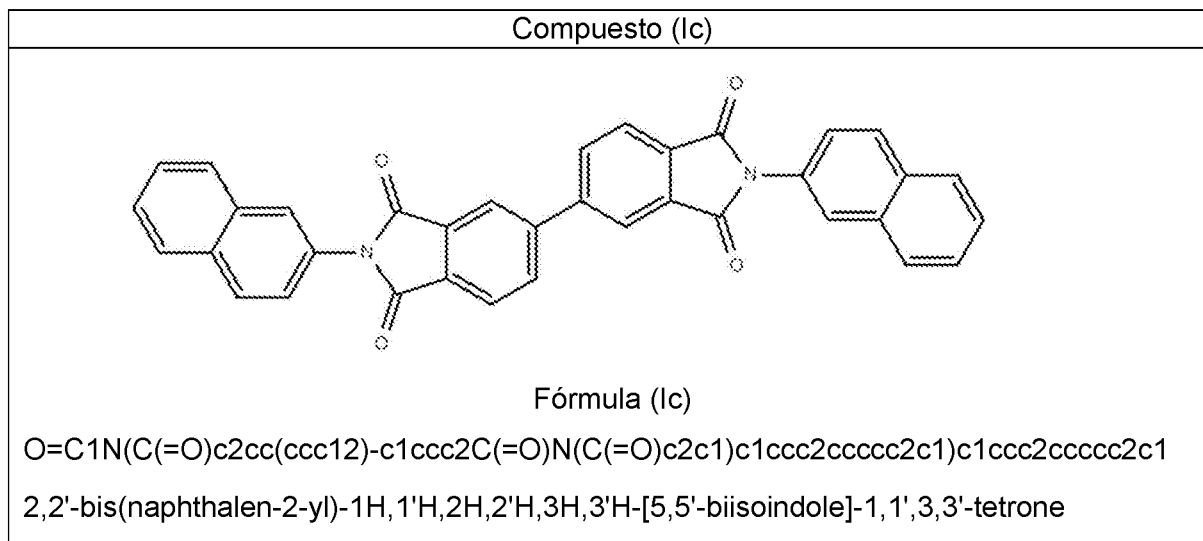
Compuesto (Ib)



Fórmula (Ib)

O=C(Nc1ccccc1-c1ccccc1)c1ccc(cc1)N1C(=O)c2ccc(cc2C1=O)C(=O)Nc1ccccc1-c1ccccc1

N-[[1,1'-biphenyl]-2-yl]-2-[4-({[1,1'-biphenyl]-2-yl}carbamoyl)phenyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindole-5-carboxamide



El compuesto de acuerdo con la fórmula (I) puede ser preferiblemente el compuesto de la fórmula (Ia). Sorprendentemente, el compuesto (Ia), a pesar de tener un peso molecular de 752 Da, y por lo tanto estar por encima de 500 Da, siendo este el peso molecular máximo de acuerdo con las reglas de cinco de Lipinsky, se ha observado que muestra actividad inhibitoria de CDK4 en sistemas celulares, lo que indicaría que tendría penetrabilidad de las membranas celulares.

Estos compuestos están disponibles comercialmente. Se pueden obtener, por ejemplo, del proveedor Molport (accesible en línea en la dirección: <https://www.molport.com/>, con los códigos de acceso: Molport-001-025-593 para el compuesto (Ia); Molport-002-134-975 para el compuesto (Ib) y Molport-001-024-020 para el compuesto (Ic)). Otros compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I) también son disponibles comercialmente y/o se pueden preparar por métodos conocidos.

Compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I), incluyendo las ejecuciones particulares y preferentes tal y como se detallan más arriba, se han identificado útiles para su uso como un medicamento. En concreto, compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I), incluyendo particularmente las ejecuciones particulares y preferentes tal y como se detallan más arriba, ventajosamente tienen actividad contra células cancerígenas, en particular contra células de líneas celulares humanas de GBM (p.ej., HGUE-GB-42 y HGUE-GB-39), las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas humano (p.ej., RWP-1) y cáncer colorrectal (p.ej., SW-480). Sin estar ligados a una teoría, su actividad anticancerígena se puede atribuir a la interacción de estas moléculas con CDK4 y en particular en la zona de unión con Cyc D1, actuando como inhibidores de CDK4. Dada su afinidad para la unión a

CDK4 y su efecto como inhibidores de CDK4, abre la puerta al tratamiento de dolencias asociadas a la sobreexpresión de CDK4 como el cáncer, en particular GBM, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer como cáncer de mama, linfoma de células del manto, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, y cáncer ginecológico.

5 Por lo tanto, en realizaciones particulares el medicamento puede ser para el tratamiento de una enfermedad. Más preferentemente, un compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula (I), tal y como se describen más arriba, puede ser para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer. Particularmente, el medicamento puede ser para el tratamiento de, por ejemplo, de GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de  
10 colon, linfoma de células del manto, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, y/o cáncer ginecológico; en particular para el tratamiento de GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, y/o cáncer de colon; y más en particular para el tratamiento de GBM.

La presente memoria también se dirige al uso de compuestos de estructura de acuerdo con la fórmula (I) en un método de tratamiento. Dicho método puede comprender, entre otros,  
15 la administración a un sujeto de un compuesto estructura de acuerdo con la fórmula (I), tal y como se describe más arriba. En particular el sujeto puede ser humano o no humano. Por ejemplo, sujeto puede ser un mamífero y preferentemente un humano, aunque no se descarta el uso en animales. El sujeto puede padecer cáncer.

En realizaciones particulares, un compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula  
20 (I), puede ser para su uso como medicamento o un tratamiento. Este puede comprender administrar el compuesto, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto y un excipiente farmacéuticamente aceptable, a un sujeto que padece cáncer, en particular padece glioblastoma (GBM), cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de colon, linfoma de células del manto, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, y/o cáncer  
25 ginecológico, más en particular padece GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, y/o cáncer de colon, y todavía más en particular padece GBM.

La presente memoria también se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula (I), tal y como se describe más arriba, y como mínimo un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 El excipiente farmacéuticamente aceptable incluye rellenos, absorbentes, agentes humectantes, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, vehículos (p.ej., solventes como agua o mezclas de solventes), solubilizantes, surfactantes, reguladores de pH, isotonzantes, conservantes, antioxidantes y similares.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la composición farmacéutica  
35 incluye, pero no se limita a, una formulación adecuada para administración oral y parenteral

(p.ej., una formulación inyectable). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación adecuada para la administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación sólida, y en particular una formulación sólida adecuada para la administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación adecuada para la administración parenteral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una formulación líquida, y en particular una formulación líquida adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, una formulación inyectable.

El compuesto puede ser el único agente terapéutico o principio activo de la composición farmacéutica o puede combinarse con otros agentes terapéuticos, dentro de la misma composición farmacéutica o utilizarse en combinación con otros agentes terapéuticos formulados separadamente.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender además un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional puede ser un agente terapéutico conocido en el tratamiento contra el cáncer, preferiblemente un agente terapéutico para GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, y/o cáncer de colon. A modo de ejemplo el agente terapéutico adicional puede seleccionarse de entre inhibidores de, p.ej., CDK4, CDK5 y/o CDK6; preferentemente un compuesto seleccionado de entre: palbociclib, ribociclib, abemaciclib, gemcitabina y carmustina (BCNU).

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede estar formulada para la liberación controlada del compuesto y/o del agente terapéutico adicional.

La composición farmacéutica descrita en este documento puede fabricarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica, como la mezcla convencional, la disolución, la granulación, la fabricación de grageas, la leviga, la emulsión y la liofilización.

Una composición oral sólida puede prepararse mediante mezcla, llenado o comprimidos convencionales. Por ejemplo, se puede obtener mediante el siguiente método: mezclando los compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, agregando excipientes adicionales adecuados si se desea, y procesando la mezcla en gránulos para obtener las partes centrales de tabletas o grageas. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, deslizantes, edulcorantes o agentes aromatizantes y similares.

Una composición parenteral líquida puede prepararse mediante disolución, suspensión y mezcla. Por ejemplo, se puede obtener mediante el siguiente método: mezclando el compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula (I) con un vehículo adecuado (p.ej., agua o una mezcla de solventes adecuada), mezclando y agregando excipientes adicionales adecuados si se desea, y procesando la disolución y/o suspensión para obtener

una formulación inyectable. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: solubilizantes, surfactantes, reguladores de pH, isotonzantes, conservantes y antioxidantes.

Administrar el compuesto o la composición farmacéutica puede realizarse a través de múltiples vías de administración, incluidas, entre otras, las administraciones oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, transdérmica, intraperitoneal, sublingual, rectal, transbucal, intranasal, inhalatoria, vaginal, intraocular, tópica, subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intraperitoneal e intratecal. En realizaciones específicas, el compuesto o la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, intraperitoneal, y/o intravenosa.

La cantidad del compuesto administrada puede determinarse de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, la respuesta de la enfermedad, cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento y la edad y el estado de salud del paciente.

En este texto, las palabras "comprende", "incluye" y sus variantes (como "comprendiendo", "incluyendo", etc.) no deben interpretarse de forma excluyente, es decir, no excluyen la posibilidad de que lo descrito incluya otros elementos, pasos, etc. En este texto "un" se refiere a al menos uno, es decir uno o más.

Por otra parte, la invención no está limitada a las realizaciones concretas que se han descrito sino abarca también, por ejemplo, las variantes que pueden ser realizadas por el experto medio en la materia (por ejemplo, en cuanto a la elección de materiales, dimensiones, componentes, configuración, etc.), dentro de lo que se desprende de las reivindicaciones.

La presente divulgación se ilustra además con los siguientes ejemplos, sin limitarse a ellos ni por ellos.

## EJEMPLOS

### Experimentos *in vitro*:

La actividad de los tres compuestos de estructuras de acuerdo con la fórmula (Ia), (Ib) y (Ic), referidos respectivamente también como compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), se determinó *in vitro* mediante distintos experimentos con las proteínas CDK4 y Cyc D1 y líneas celulares cancerígenas tal y como se describe a continuación.

Los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) se obtuvieron del proveedor MolPort (accesible a través de su portal en línea: <https://www.molport.com/>, con los códigos de acceso: Molport-001-025-593 para el compuesto (Ia); Molport-002-134-975 para el compuesto (Ib); y Molport-001-024-020 para el compuesto (Ic).

Para los ensayos los compuestos se disolvieron en DMSO y se diluyeron con agua hasta la concentración de ensayo para el tratamiento de las células. Como control se utilizó la

máxima concentración del vehículo disolvente (DMSO) de cada compuesto testado en la concentración de ensayo.

Se utilizaron líneas celulares de GBM humanas HGUE-GB-42 y HGUE-GB-39. El aislamiento de las líneas celulares de GBM humanas HGUE-GB-42 y HGUE-GB-39 se realizó a partir de lavados quirúrgicos, tal y como describen Ventero *et al.* (PLOS ONE 2019, 14(4), e0215714; [DOI: 10.1371/journal.pone.0212581]). A continuación, las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM F-12) (Biowest, MO, EE. UU.). El Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM, Barcelona, España) donó las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas humano (RWP-1) y cáncer colorrectal (SW-480). Las líneas celulares RWP-1 y SW-480 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco: alto contenido de glucosa (DEMEM-HG) (Biowest, MO, EE. UU.). Ambos medios se complementaron con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania) y un 1 % (v/v) de una mezcla de penicilina/estreptomicina (Biowest, MO, EE. UU.). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>, tal y como describen Fuentes-Baile *et al.* (*Biomolecules* 2020, 10(2), 222; [DOI: 10.3390/biom10020222] y *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(3), 1477; [DOI : doi.org/10.3390/ijms22031477]).

#### Estudio de la proliferación celular:

La capacidad antiproliferativa de los diferentes compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) se analizó utilizando el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) basado en la reacción de reducción catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Tras añadir el compuesto MTT de color amarillo, la succinato deshidrogenasa de la células viables cataliza la apertura del anillo de tetrazol, generando sales de formazán ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán), que son insolubles, impermeables a la membrana plasmática y de color morado. De este modo, es posible cuantificar la cantidad de células viables, puesto que es proporcional a la cantidad de formazán generado.

Inicialmente, se sembraron células HGUE-GB-39 en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000-4.000 células por pocillo dependiendo del tamaño y la velocidad de crecimiento de la línea celular. Pasadas 24 horas, se añadieron los tratamientos correspondientes por sextuplicado con concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), en un rango de 0,1-25 µM y se mantuvieron en cultivo 72 horas. Finalizado el tiempo de tratamiento, se añadió el reactivo MTT (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a una concentración final de 0,25 mg/mL durante 3 horas. Durante todo

el tiempo del ensayo, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y las placas se mantuvieron 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación intensa para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia de las placas a 570 nm en un lector de placas Gen5™ (BioTeK®, Winooski, VT, Estados Unidos), tal y como describen Grasso *et al.* (*BMC Cancer* 2015, 15, 240; [DOI: 10.1186/s12885-015-1183-3]).

Como control, las células fueron tratadas con la máxima concentración del vehículo disolvente (DMSO) de cada compuesto testado, siguiendo el mismo proceso descrito para la realización del estudio.

Los efectos sobre la proliferación se compararon con los obtenidos en el mismo rango de concentraciones con los fármacos inhibidores de CDK4 abemaciclib y palbociclib.

En la Figura 3, se muestran los resultados obtenidos representándose los porcentajes de células viables tras el tratamiento con los diferentes compuestos, en un rango de concentración de 0,1 a 25 µM, obtenidos en ensayos MTT, y referidos al 100% de células viables como aquellas células sólo tratadas con vehículo (DMSO), añadido al 1% en volumen.

Además, se utilizaron distintas concentraciones en el rango de 0,1-50 µM, para obtener la concentración inhibitoria al 50%, IC<sub>50</sub>, de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) evaluando la viabilidad de células de la línea HGUE-GB-39 en presencia de estos compuestos, y se compararon con la viabilidad de las células en presencia de palbociclib, obteniéndose los siguientes valores de IC<sub>50</sub>: de 5.9 µM para el compuesto (Ia), de 25.2 µM para el compuesto (Ib), de 17.7 µM para el compuesto (Ic), y de 7.5 µM para palbociclib.

#### Análisis del ciclo celular:

Para determinar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular se utilizó el marcaje con yoduro de propidio, un compuesto fluorescente impermeable a la membrana plasmática que se intercala en el material genético de las células. El yoduro de propidio tiene un pico de excitación a 535 nm (azul-verde) y su máximo de emisión se produce a 617 nm (rojo).

El ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M. Durante la fase G1 las células crecen, sintetizan proteínas y ARN y aumenta el número de ciertas estructuras citoplasmáticas y orgánulos, en la fase S se produce la replicación del ADN, en la fase G2 las células continúan creciendo y produciendo las proteínas necesarias para la división celular y, la fase M se corresponde con la mitosis o división de las células. La fase G1 es la de mayor duración de modo que en su estado normal, la mayoría de las células se encuentran en esta fase. Una



vez eliminado el ARN con ribonucleasa (RNasa), es posible diferenciar entre las fases del ciclo celular según su contenido de ADN, ya que las células que se encuentran en fase G2 o M presentan el doble de contenido de ADN que las que se encuentran en fase G1. El marcaje de las células con yoduro de propidio y el posterior análisis mediante citometría de flujo, permite diferenciar entre las distintas fases del ciclo celular en función de la intensidad de fluorescencia. Con este tipo de ensayo es posible detectar las células muertas, ya sea por apoptosis o necrosis, puesto que su ADN se encuentra fragmentado, por lo que la intensidad de fluorescencia es inferior a la observada en las células vivas, esto se conoce como la fase SubG1. Por lo tanto, mediante el análisis del ciclo celular podemos determinar no sólo si el tratamiento tiene efecto sobre las células, sino también es posible diferenciar si dicho efecto es citotóxico (muerte celular) o citostático (bloqueo del ciclo celular en alguna de las fases), tal como describen Al-Malky *et al.* Cancer Cell Int. 2019. 19:191., [DOI: 10.1186/s12935-019-0912-0].

Para realizar este tipo de estudio, se sembraron entre 250.000-350.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas de incubación, se les añadió el tratamiento correspondiente, una concentración del compuesto (Ia) de 10  $\mu$ M y una concentración de abemaciclib de 10 y 25  $\mu$ M, que se mantuvo durante un tiempo mínimo de 24 horas que es aproximadamente lo que dura el ciclo celular en los mamíferos.

Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos, se resuspendieron en 1 mL de etanol frío al 75% y se incubaron a -20°C durante un mínimo de 1 hora para fijarlas. A continuación, se retiró el etanol mediante otra centrifugación de 5 minutos a 400 x g y las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de una disolución de PBS que incluye Tritón X-100 al 0,5% (v/v) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) para permeabilizar la membrana plasmática, 25  $\mu$ g/mL de RNasa A (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) para eliminar el ARN, y 25  $\mu$ g/mL de yoduro de propidio (Promocell®, Heidelberg, Alemania). Finalmente, tras 30 minutos de incubación en oscuridad, se realizó el análisis del ciclo celular con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos), tal y como describen Castro-Galache *et al.* (Int. J. Cancer 2003, 104(5), 579-586; [DOI: 10.1002/ijc.10998]).

Para evaluar la inducción de muerte celular en las líneas celulares HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 por el compuesto (Ia) y compararlo con la del inhibidor abemaciclib, el efecto del abemaciclib a 10  $\mu$ M en cada línea celular se utilizó como valor de 100 % de referencia. En la Figura 4A, se muestran los resultados obtenidos, representando el porcentaje de células muertas obtenidas. Como se puede observar a la misma concentración de 10  $\mu$ M el compuesto (Ia) mostró una cantidad mayor de células muertas que abemaciclib para las dos

líneas celulares. Además, para línea celular HGUE-GB-39 el compuesto (Ia) mostró una cantidad mayor células muertas que abemaciclib a una concentración superior (de 25  $\mu$ M).

Por lo tanto, el compuesto (Ia) tendría una actividad contra las líneas celulares de GBM superior, indicando una eficacia potencial para el tratamiento de GBM en organismos vivos.

5

#### Ensayo de fosforilación:

Se evaluó el efecto de los inhibidores de CDK4 abemaciclib y palbociclib y de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), a una concentración 10  $\mu$ M, sobre la actividad enzimática de fosforilación del complejo CDK4-Cyc D1 recombinante, sobre un péptido sintético obtenido de la proteína de la retinoblastoma (Rb) (sustrato natural de CDK4) mediante la utilización del kit ADP-Glo de Promega, Madison, WI, USA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4B. El 100% representa la máxima actividad enzimática observada con el complejo recombinante, en presencia de la dosis más alta del vehículo (DMSO al 1% en volumen), utilizado para solubilizar los compuestos. Se promedian 3 experimentos y se muestra media  $\pm$  D.E. (desviación estándar).

15

Brevemente se diluyó la enzima CDK4/Cyc D1 a 0,1 mg/ml en solución tampón 20 mM Tris (pH 7.5), 0.02% Tritón X-100, 0,1 mg/ml BSA, 2 mM DTT, 0,5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10% glicerol. Se preparó otra solución tampón (100 ml) con 2 ml Tris 1M, 20  $\mu$ l Tritón X-100, 10 mg BSA, 30,84 mg DTT, 9,2 mg  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 ml glicerol, y 88 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Se preparó CDK4/Cyc D1 0,35 mg/ml y se añadió 71,43  $\mu$ l de la solución tampón preparada para diluir la CDK4/Cyc D1 a 0,1 mg/ml y alícuotar en 5 eppendorf de 20  $\mu$ l. Para preparar una alícuota de 10  $\mu$ g/ml se añadió  $\text{H}_2\text{O}$ . Finalmente se añadió el ATP y se incubó la placa 1h a temperatura ambiente. Se añadió 5  $\mu$ l del reactivo ADP-Glo para parar la reacción y deplecionar el ATP que no se ha consumido y 10  $\mu$ l del reactivo de detección de kinasas para convertir el ADP en ATP e introducir luciferasa y luciferina para detectar ATP. Se incubó a temperatura ambiente según las instrucciones del fabricante. Finalmente se midió la luminiscencia.

20

25

Se observó que los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) son capaces de inhibir la actividad enzimática quinasa de la enzima CDK4/Cyc D1 en porcentajes que van desde el 60% (compuesto Ic), 95% (compuesto Ib) y 90% (compuesto Ia) cuando estos se añaden a una concentración de 10  $\mu$ M. Estos valores son muy similares a los efectos que ejercen el palbociclib o el abemaciclib, como se muestra en la Figura 4B.

30

#### Inmunofluorescencia:

Para comprobar si ambas proteínas (CDK4 y Cyc D1) se expresaban y colocalizaban en los mismos compartimentos celulares en las distintas líneas celulares (Fig. 1) se realizaron

35

ensayos de inmunofluorescencia. Las líneas celulares evaluadas fueron: HGUE-GB-42 y HGUE-GB-39 de GBM, RWP-1 de cáncer de páncreas y SW-480 de cáncer colorrectal.

Se sembraron una cantidad de 35.000 células de las líneas celulares HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480 en placas de veinticuatro pocillos sobre cubreobjetos de 12 mm. Después de 24 h, se fijaron con paraformaldehído (PFA) a una concentración del 4 % y se bloquearon con FBS/PBS (1 ×) (50 µL/mL). A continuación, las células se incubaron con anticuerpos anti-CDK4 (1:100, ratón; NeoMarkers, California, USA) y anti-CyD1 (1:100, conejo; Cell Signaling, Massachusetts, USA).

Después de lavar el primer anticuerpo, las células se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón marcados con Alexa Fluor 568 (1:500) y anti-conejo marcados con Alexa Fluor 488 (1:500) (Invitrogen, Barcelona, España); Se utilizó el reactivo DAPI para teñir el núcleo. Los cubreobjetos se montaron en Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Barcelona, España) y se analizaron utilizando un LSM900 confocal con un microscopio Airyscan 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un aumento de × 63.

Los resultados de la localización de las proteínas se muestran en la Figura 5 para los distintos tipos de células evaluados HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480.

Se observó que CDK4 estaba altamente expresada en el núcleo de las células de GBM (HGUE-GB-42 y HGUE-GB-39) como muestra la colocalización con DAPI y también en el citoplasma. Sin embargo, se expresa mayoritariamente en el citoplasma de las células tumorales pancreáticas (RWP-1) y de adenocarcinoma de colon (COAD) (SW-480).

De forma similar, Cyc D1 se expresaba tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células de GBM, pero también en el resto de las líneas tumorales.

La colocalización de estas dos proteínas fue medida mediante el coeficiente de correlación de Pearson (PRV), tal y como se ilustra en la Figura 6, que confirmó el hecho de que en GBM, CDK4 y Cyc D1 tienen un mayor nivel de coexpresión (con un PRV de 0.451 para HGUE-GB-39 y de 0.495 para HGUE-GB-42), que en cáncer de páncreas (con un PRV de 0.373 para RWP-1) y de cáncer colorrectal (con un PRV de 0.285 para SW-480).

#### **Ensayo de ligadura de proximidad (PLA):**

Para determinar la capacidad de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) de bloquear la interacción entre CDK4 y Cy-D1, se estudió la interacción entre estas dos proteínas en distintas líneas celulares. Se sembraron una cantidad de 35.000 células de líneas celulares HGUE-GB-42, HGUE-GB-39, RWP-1 y SW-480 en placas de veinticuatro pocillos sobre cubreobjetos. Las células fueron tratadas con los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) (10 µM) durante 6 horas y después se lavaron en PBS (1x), se fijaron con PFA al 4 %, se lavaron nuevamente,

se permeabilizaron en PBS (1x) con Triton X-100 al 0,2 % y se bloquearon con solución bloqueadora durante 1 h a 37 °C antes de la inmunotinción con DuoLink mediante tecnología PLA (Merck, Madrid, España), siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-CDK4 (1:100, ratón; NeoMarkers, California, USA) y anti-CyD1 (1:100, conejo; Cell Signaling, Massachusetts, USA). Los portaobjetos se procesaron para PLA *in situ* utilizando secuencialmente DuoLink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS, DuoLink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS y los reactivos de detección DuoLink In Situ Red (Merck, Madrid, España).

En estos experimentos, los puntos fluorescencia (rojos) corresponden a las señales positivas para PLA, lo que indica que las dos proteínas (CDK4 y Cyc D1) están unidas, formando un complejo proteico; por el contrario, las manchas de fluorescencia azules corresponden a núcleos (tinción DAPI). Esta técnica, revela la unión de proteínas que se produce a distancias inferiores a 16 Å.

Se realizaron experimentos de control tanto negativo como positivo, el primero omitiendo uno de los anticuerpos primarios.

La adquisición de imágenes se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal LSM900 con Airyscan 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un aumento de  $\times 63$ . El número de puntos rojos se contó utilizando el software Fiji (Imagen J2).

Los resultados se dan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes ( $n = 5$  imágenes). Para evaluar la distribución normal de los datos se utilizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk o la prueba *t de Student* para analizar la asociación entre variables. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism v7.0a (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.)

Se trataron todas las líneas celulares con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  del compuesto (Ia) durante 6 horas y con el control. Ejemplos de las imágenes obtenidas con el compuesto (Ia) se muestran en la Figura 7A. Los puntos fluorescentes (rojos) correspondientes a las señales PLA (indicado en la figura como "PLA: CDK4/Cyc D1"), indican que CDK4 interaccionó eficientemente con Cyc D1, mayoritariamente dentro del núcleo en todas las líneas tumorales en la situación control como era de esperar por los experimentos de inmunofluorescencia (Figura 5-6). También se trataron las líneas celulares HGUE-GB-42 y HGUE-GB-39 con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  del compuesto (Ib) y (Ic) durante 6 horas y el control. Los resultados obtenidos con los compuestos (Ib) y (Ic) se muestran en la Figura 7B.

En la Figura 8 se muestra la cuantificación, en forma de grafico de barras, del número de puntos fluorescentes por célula, tratada con el control (DMSO) o con los compuestos (Ia)

(Ib) y (Ic). Se utilizó el software Fiji para contabilizar el número de puntos rojos. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, ANOVA de 1 vía, se utilizó la prueba post hoc de Tukey, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

El tratamiento con el compuesto (Ia), confirmó que la interacción entre CDK4 y CyD1 era desplazada por el mismo, para todas las líneas celulares testadas. Se observó que el compuesto (Ia) fue incluso más eficiente en la línea que HGUE-GB-42 que en la otra línea de GBM (HGUE-GB-39), que resultó ser la línea donde menos se veían afectadas las interacciones nucleares de CDK4 y Cyc D1. En los otros dos tipos de cáncer la reducción de la interacción entre las dos proteínas también se vio seriamente afectada por el compuesto (Ia), lo que es un indicador de la efectividad de este tipo de compuestos no solo en una terapia contra el GBM, sino que también puede afectar otros tipos de cáncer (Figura 7-8).

Se observa que el número de puntos por célula disminuye en presencia del compuesto (Ib) y (Ic). Si bien el compuesto (Ic) mostró un descenso en el número de puntos por célula similar para los dos tipos de líneas celulares, el compuesto (Ib) mostró un descenso más marcado para las células HGUE-GB-39, pero quizás más sorprendente es que incluso mostró un descenso más importante para estas células que el compuesto (Ic).

#### **Simulaciones computacionales:**

Otras propiedades de los tres compuestos de estructuras de acuerdo con la fórmula (Ia), (Ib) y (Ic), referidos respectivamente también como compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), se determinaron *in silico* mediante distintas simulaciones.

#### **Propiedades ADMET:**

Las propiedades *in silico* de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET) se calcularon utilizando la aplicación web AdmetSAR, tal y como describen Cheng *et al.* (*J. Chem. Inf. Model.* 2012, 52, 11, 3099–3105; [DOI: 10.1021/ci300367a]), y el software DataWarrior (v. 5.0), tal y como describen Sander *et al.* (*J. Chem. Inf. Model.* 2015, 55, 2, 460–473; [DOI: 10.1021/ci500588j]). Los parámetros evaluados fueron: la superficie total, la superficie polar topológica, el LogS calculado, el peso molecular, el logP calculado, aceptores de enlaces de hidrógeno, violaciones de la regla de los cinco de Lipinski, donantes de enlaces de hidrógeno, semejanza del fármaco, puntuación del fármaco, permeabilidad Caco-2 calculada, toxicidad aguda calculada en ratas, toxicidad calculada en *Tetrahynema pyriformis* y toxicidad calculada en peces (datos no mostrados).

Los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) mostraron propiedades ADMET que no siempre serían consideradas dentro de las óptimas. Por ejemplo, violan una o más de las reglas del cinco de

Lipinsky, El compuesto (Ia) tiene un peso molecular (752 Da) de más de 500 Da, logP calculado mayor de 5 (Ia= 6,44, Ib=7,37 y Ic= 8,10), y Ic tiene 13 aceptores de enlaces de H (cuando la regla de Lipinsky habla de no más de 10), el número de donadores en menor de 3 para los tres compuestos. Sin embargo, como se ha demostrado los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) muestran actividad inhibidora al ser utilizados para tratar líneas celulares, incluso mejor que otros compuestos conocidos como inhibidores de CDK4.

### Acoplamiento molecular:

Las simulaciones de acoplamiento molecular de los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), se llevaron a cabo utilizando el software YASARA structure v22.5.22, ejecutando el algoritmo AutoDock 4 con AMBER99 como campo de fuerza, tal y como describen Encinar *et al.* (*Drug Des Devel Ther.* 2015, 9, 5877–5895; [DOI: 10.2147/DDDT.S93449]), Galiano *et al.* (*Drug Des Devel Ther.* 2016, 10, 3163–3181; [DOI: 10.2147/DDDT.S117369]), y Ruiz-Torres *et al.* (*Mar. Drugs* 2018, 16, 385; [DOI: 10.3390/md16100385]). Se establecieron un total de 100 ejecuciones de acoplamiento flexible y se agruparon (7 Å) alrededor de la superficie de interacción entre CDK4 y la Cyc D1, es decir, dos compuestos acoplados a CDK4 pertenecían a diferentes agrupaciones si la desviación cuadrática media del ligando de sus posiciones atómicas era superior a 7 Å, tal y como describen Cuyàs *et al.* (*Food and Chemical Toxicology* 2019, 132, 110645; [DOI: 10.1016/j.fct.2019.110645]).

El software YASARA calculó la variación de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ , Kcal/mol), donde los valores de energía más positivos indican una unión más fuerte a CDK4 tal y como describen Rubio-Camacho *et al.* (*Biomolecules* 2020, 10, 1015; [DOI: 10.3390/biom10071015]). Para calcular este parámetro, Autodock Vina utiliza una función de puntuación de campos de fuerza que considera la fuerza de las interacciones electrostáticas, los enlaces de hidrógeno entre todos los átomos de los dos socios de unión, en el complejo, las fuerzas intermoleculares de van der Waals, y las contribuciones de solvatación y entropía, tal y como describen Morris *et al.* (*J. Comp. Chem.* 2009, 30, 16, 2785–2791; [DOI: 10.1002/jcc.21256]).

Para la enzima CDK4 de humanos (código UniProt: P11802 · CDK4\_HUMAN) se utilizó la estructura 6P8E (<https://www.rcsb.org/structure/6P8E>) depositada en la base de datos Protein Data Bank. En esta estructura, CDK4 se encuentra co-cristalizada con la Cyc D1 y la proteína reguladora P27. Las dimensiones de la cuadrícula fueron  $23 \times 23 \times 23$  Å. El estado de protonación fue adecuado a pH 7,4 para las cadenas laterales CDK4 utilizando el software YASARA structure v22.5.22, tal y como describen Krieger *et al.* (*Bioinformatics* 2014, 30, 20 2981–2982 [DOI: 10.1093/bioinformatics/btu426]). Tras cada simulación de

acoplamiento, el software YASARA generó un archivo que contenía las coordenadas moleculares de diferentes poses de cada compuesto de la librería acoplado al sitio de unión en la proteína CDK4, así como la variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ , kcal/mol) para cada pose. Los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), mostraron una  $\Delta G \geq 9,5$  kcal/mol, lo que es indicador de un buen acoplamiento de los compuestos a CDK4, en particular en su zona de interfaz con la Cyc D1, y de su potencial actividad inhibidora, como se ha demostrado también en los experimentos *in vitro*.

#### Dinámica molecular:

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo usando el software YASARA structure v22.5.22, con AMBER14 como campo de fuerza, tal y como describen Encinar *et al.* (*Viruses* 2020,10, 12(5), 525; [DOI: 10.3390/v12050525]), Marroqui *et al.* (*Chemosphere* 2021, 265, 129051; [DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129051]), Verdura *et al.* (*Aging* 2020, 12(1), 8–34; [DOI: 10.18632/aging.102646]), y Fernández-Ginés *et al.* (*Redox Biology* 2022, 55,102396; [DOI: 10.1016/j.redox.2022.102396]). Se permitió que la celda de simulación incluyera 20 Å alrededor de la proteína CDK4, que se llenó con agua a una densidad de 0,997 g/ml. La minimización de la energía inicial se llevó a cabo bajo restricciones relajadas utilizando la minimización de descenso más pronunciado. Las simulaciones se realizaron en agua a presión (1 atm) y temperatura (25 °C) constantes. Para imitar un entorno fisiológico, se añadieron contraiones para neutralizar el sistema ( $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  en sustitución del agua para obtener una concentración final de NaCl del 0,9% y un pH mantenido en 7,4). Se añadieron átomos de hidrógeno a la estructura de la proteína en los grupos ionizables apropiados según el pKa calculado y el pH de la simulación (es decir, se añadió un átomo de hidrógeno si el pKa calculado era superior al pH). El pKa se calculó para cada residuo según el método de Ewald, tal y como describen Krieger *et al.* (*J. Mol. Graph. Model.* 2006, 25 (4), 481–486; [DOI: 10.1016/j.jmkgm.2006.02.009]). Los datos se registraron cada 100 ps. Los cálculos de superficie de Poisson-Boltzmann de mecánica molecular (MM/PBSA) se utilizaron para determinar la energía libre de unión de los compuestos candidatos a inhibidores frente a CDK4 utilizando la macro YASARA md\_analyzebindenergy.mcr, tal y como describen Encinar *et al.* (*Viruses* 2020,10, 12(5), 525; [DOI: 10.3390/v12050525]), Marroqui *et al.* (*Chemosphere* 2021, 265, 129051; [DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129051]), Verdura *et al.* (*Aging* 2020, 12(1), 8–34; [DOI: 10.18632/aging.102646]), y Fernández-Ginés *et al.* (*Redox Biology* 2022, 55,102396; [DOI: 10.1016/j.redox.2022.102396]). Cuando un compuesto permanece unido a la superficie de interfase CDK4 con la Cyc D1 durante todo el tiempo de la simulación MD (100 ns), la medida de su trayectoria no debe superar un valor RMSD de 10 Å. Los

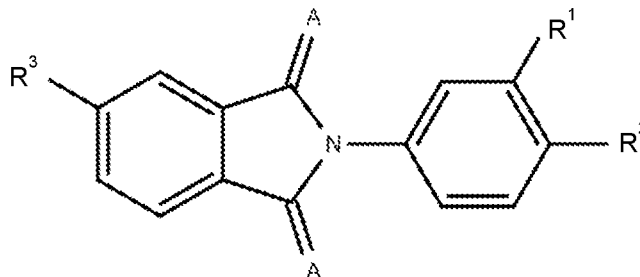
compuestos (Ia), (Ib) y (Ic) mostraron un valor RMSD inferior a 10 Å (es decir, su unión a CDK4 era estable durante 100 ns). Además, en este proceso se tuvo en cuenta el valor de la energía de enlace de solvatación MM|PBSA, tal y como describen Gnheden *et al.* (*Expert Opinion on Drug Discovery* 2015, 10(5), 449–461; [DOI: 10.1517/17460441.2015.1032936]) y

5 Wang *et al.* (*Comp. Chem.* 2016, 37(27), 2436–2446; [DOI: 10.1002/jcc.24467]). Los compuestos (Ia), (Ib) y (Ic), mostraron valores de MM|PBSA superiores a 20 kcal/mol para los últimos 50 ns de la simulación MD.



**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto de estructura de acuerdo con la fórmula (I) para uso como medicamento:



Fórmula (I)

en donde

- A es un átomo independientemente seleccionado de entre O y S; preferentemente A es O o S; y más preferentemente A es O;
- R¹ y R² se seleccionan independientemente de entre H, -CONH-R<sup>a</sup>, arilo y alquilo, o R¹ y R² juntos forman un anillo;
- R³ se selecciona de entre -CONH-R<sup>b</sup>, arilo y alquilo;

R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> seleccionándose independientemente de entre arilo y alquilo; y

los grupos arilo y alquilo y el anillo siendo opcionalmente sustituidos por un grupo seleccionado de entre arilo, alquilo, y halógeno; y los grupos alquilo siendo lineares o ramificados.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde

- los grupos arilo se seleccionan de entre fenilo, ftalimidilo, bifenilo, naftalenilo, bencilo;
- los grupos alquilo se seleccionan de entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, y tert-butilo;
- y/o
- el halógeno se selecciona de entre flúor, cloro, bromo y yodo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde R¹ y R² forman un anillo, preferentemente un anillo aromático, más preferentemente un anillo aromático seleccionado de entre anillo aromático de 6 miembros o de 5 miembros.

4. El compuesto según cualquiera de la reivindicación 1 o 2 en donde  $R^1$  y/o  $R^2$  es -CONH- $R^a$  y preferentemente  $R^a$  es arilo; más preferentemente el arilo se selecciona de entre fenilo, bifenilo, ftalimidilo, naftalenilo, bencilo, opcionalmente sustituido con un grupo preferentemente seleccionado de entre fenilo, bencilo, naftalenilo, etilo; y todavía más  
5 preferentemente el arilo se selecciona de entre bifenilo, naftalenilo, N-fenilo-ftalimido y N-naftalenilo-ftalimido.

5. El compuesto de la reivindicación 4 en donde uno de entre  $R^1$  y  $R^2$  es H y el otro de entre  $R^1$  y  $R^2$  es -CONH- $R^a$ , preferentemente en donde:

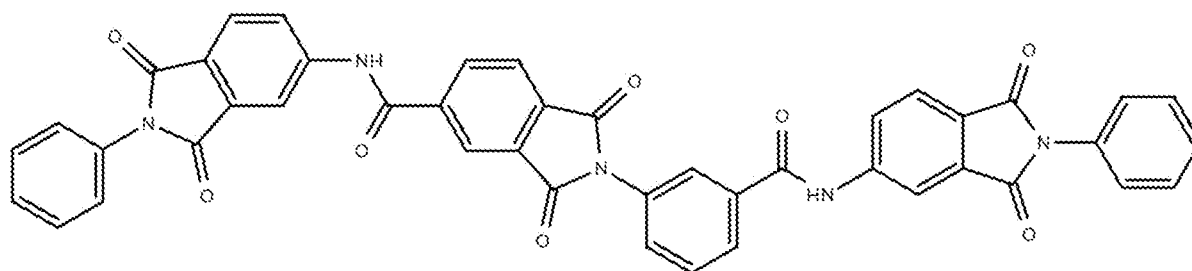
- 10
- cuando  $R^1$  es H entonces  $R^2$  es -CONH- $R^a$  y  $R^a$  se selecciona de entre bifenilo y naftalenilo; y preferentemente es bifenilo; o
  - cuando  $R^2$  es H entonces  $R^1$  es -CONH- $R^a$  y  $R^a$  se selecciona de entre N-fenilo-ftalimido y N-naftalenilo-ftalimido; y preferentemente es N-fenilo-ftalimido.

15 6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde  $R^3$  es CONH- $R^b$  y preferentemente  $R^b$  es arilo; más preferentemente el arilo se selecciona de entre fenilo, bifenilo, ftalimidilo, naftalenilo, bencilo, opcionalmente sustituido con un grupo preferentemente seleccionado de entre fenilo, bencilo, naftalenilo, y etilo; todavía más preferentemente el arilo se selecciona de entre bifenilo, naftalenilo, N-fenilo-ftalimido y N-  
20 naftalenilo-ftalimido; y todavía aún más preferentemente se selecciona de entre bifenilo y N-fenilo-ftalimido.

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde  $R^3$  es arilo; preferentemente el arilo se selecciona de entre fenilo, bifenilo, ftalimidilo, naftalenilo, bencilo,  
25 opcionalmente sustituido con un grupo preferentemente seleccionado de entre fenilo, bencilo, naftalenilo, y etilo; más preferentemente el arilo se selecciona de entre bifenilo, naftalenilo, N-fenilo-ftalimido y N-naftalenilo-ftalimido; y todavía más preferentemente el arilo es N-naftalenilo-ftalimido.

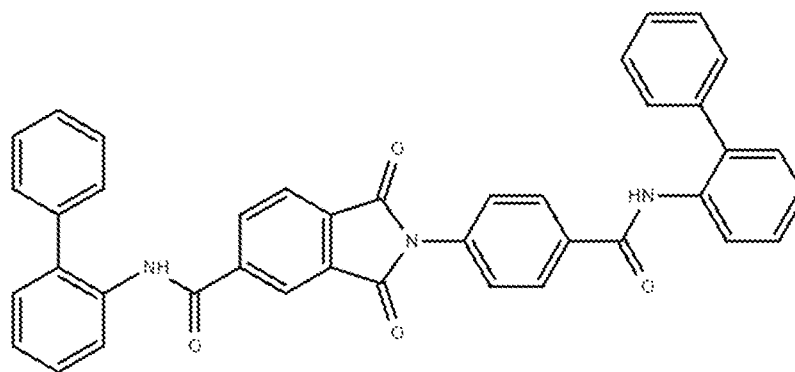
30

8. El compuesto de la reivindicación 1 en donde la fórmula (I) es de acuerdo con la fórmula (Ia):



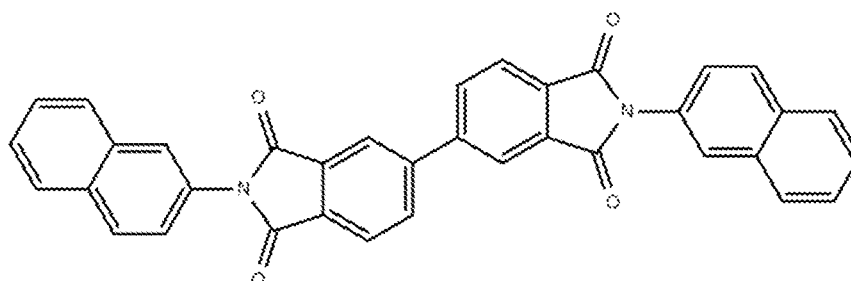
Fórmula (Ia)

9. El compuesto de la reivindicación 1 en donde la fórmula (I) es de acuerdo con la fórmula (Ib):



Fórmula (Ib)

10. El compuesto de la reivindicación 1 en donde la fórmula (I) es de acuerdo con la fórmula (Ic):



Fórmula (Ic)

11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad, preferentemente para el tratamiento de cáncer, y más preferentemente de un cáncer que sobre expresa la quinasa CDK4 y la Cyc D1, en particular GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de colon, linfoma de células del manto, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, y/o cáncer ginecológico; más en particular para el tratamiento de GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, y/o cáncer de colon; y todavía más en particular para el tratamiento de GBM.
12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde el uso como medicamento o el tratamiento comprende administrar el compuesto o una composición farmacéutica que comprende el compuesto y un excipiente farmacéuticamente aceptable, a un sujeto, siendo el sujeto humano o no humano y en particular un humano, que padece una enfermedad, particularmente en donde el sujeto padece cáncer, más en particular padece GBM, cáncer de mama, cáncer de páncreas, y/o cáncer de colon, y todavía más en particular padece GBM.
13. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 donde la formulación comprende el compuesto como único agente terapéutico o comprende un agente terapéutico adicional, en particular seleccionado de entre inhibidores de CDK4, CDK5 y/o CDK6, preferentemente un compuesto seleccionado de entre palbociclib, ribociclib, abemaciclib, gemcitabina y carmustina (BCNU).
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 o 14 que está formulada para la liberación controlada del compuesto y/o del agente terapéutico adicional.

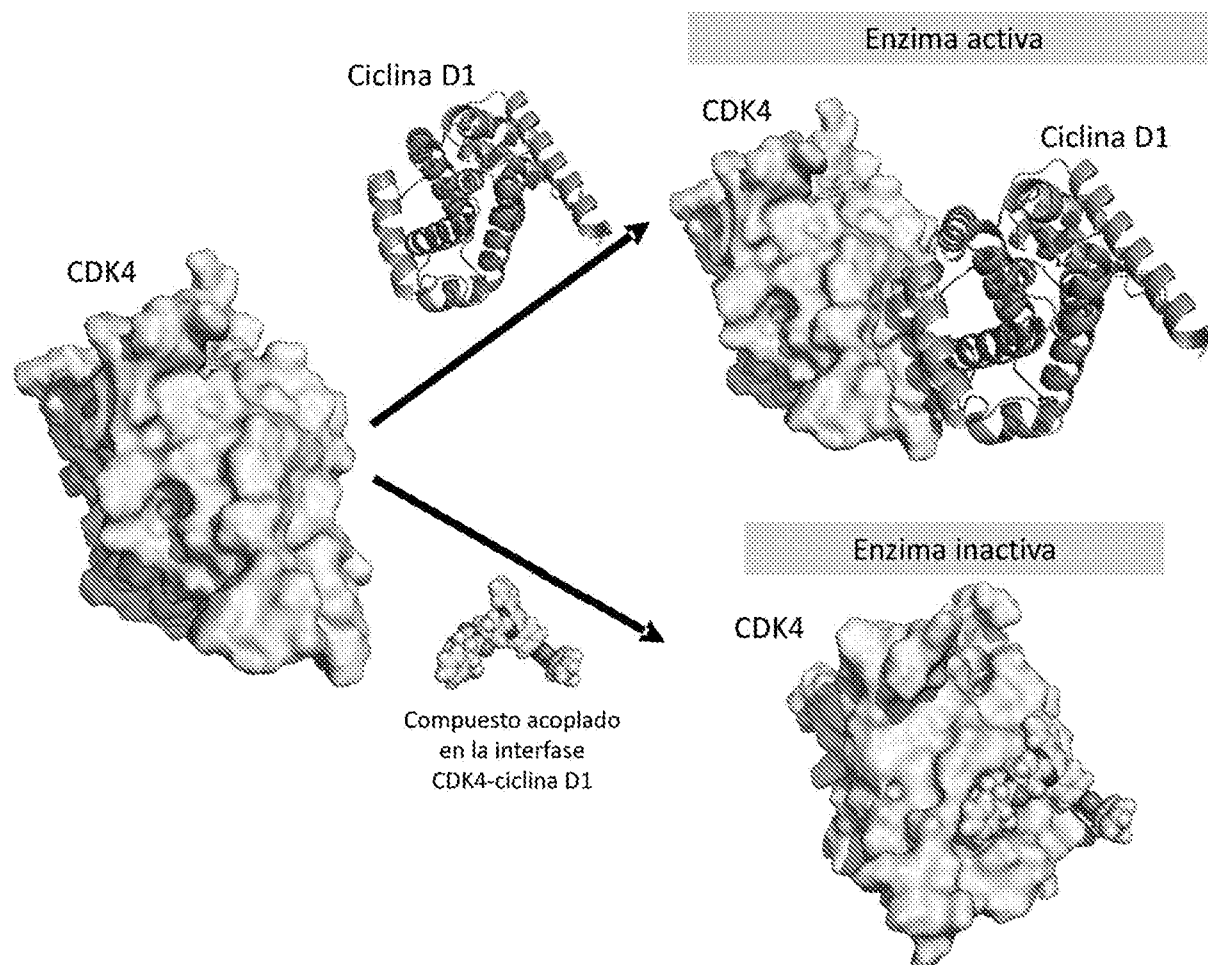


Figura 1

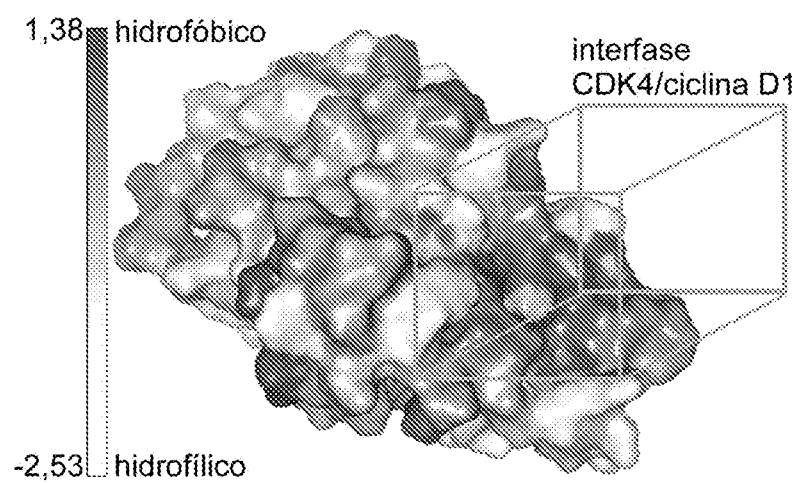


Figura 2

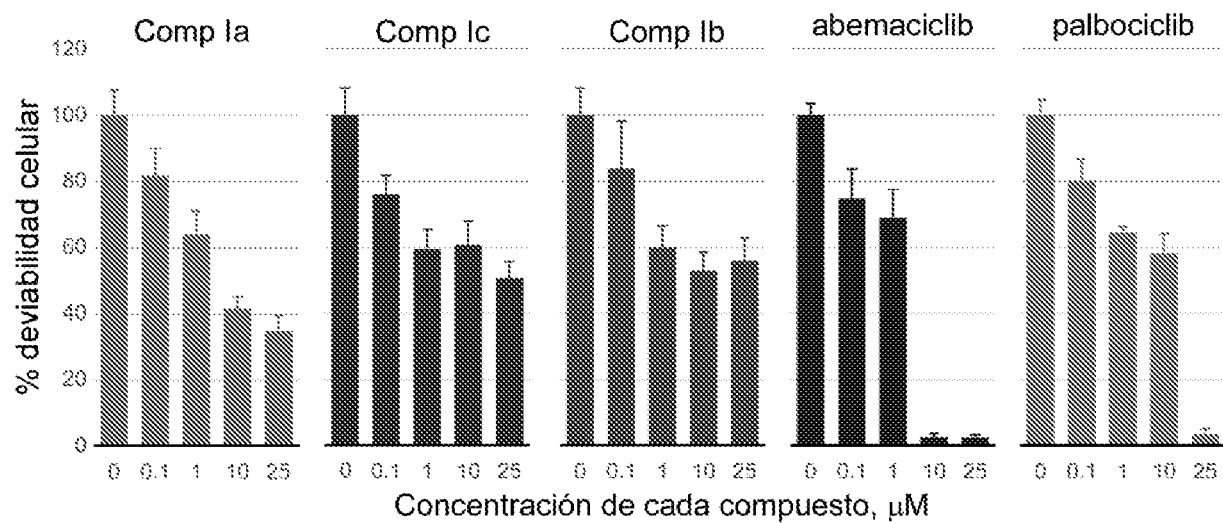


Figura 3

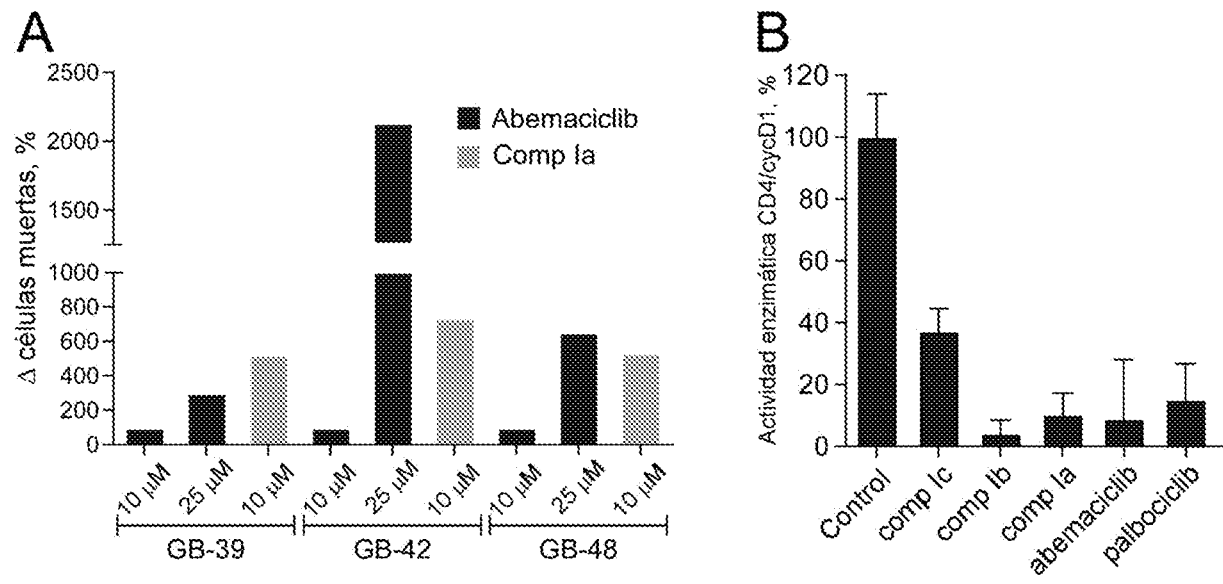


Figura 4

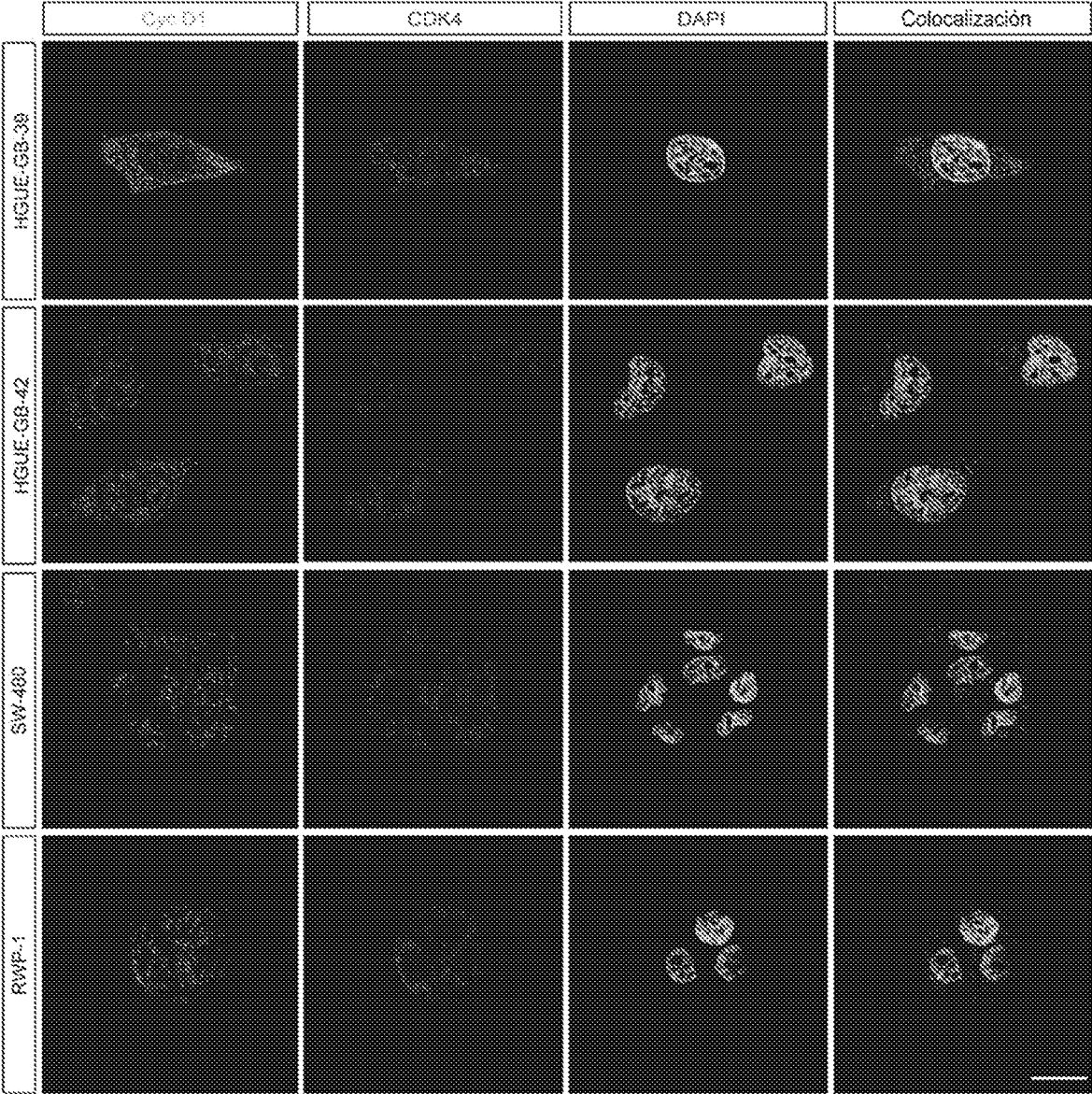


Figura 5

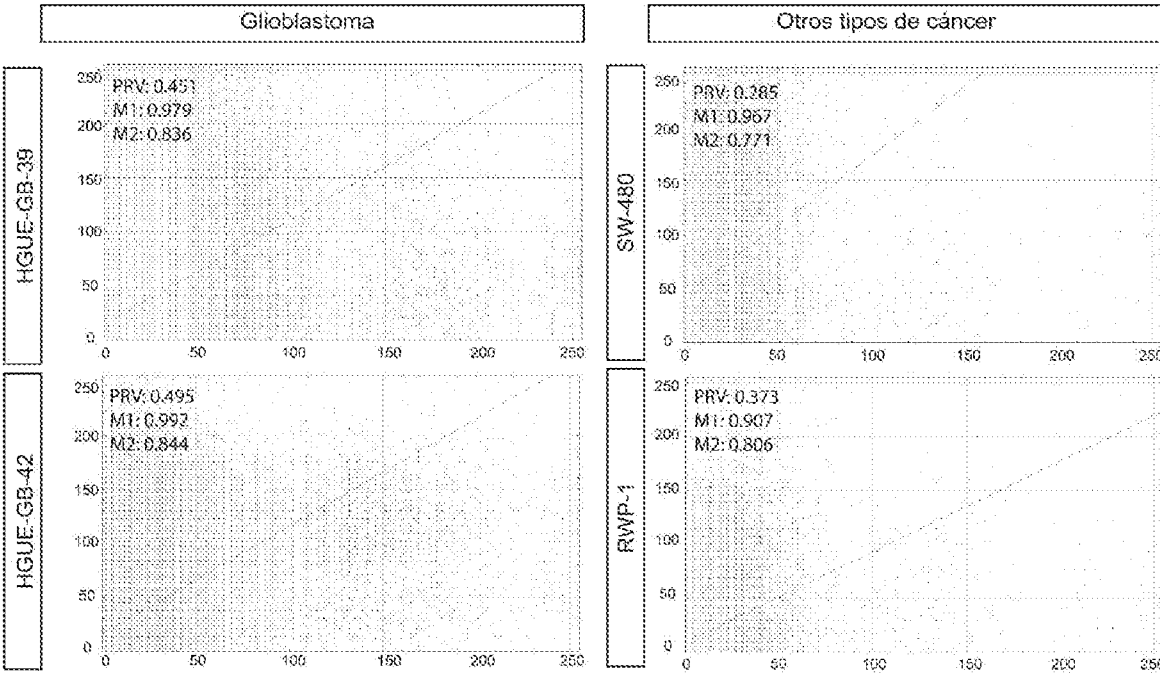


Figura 6

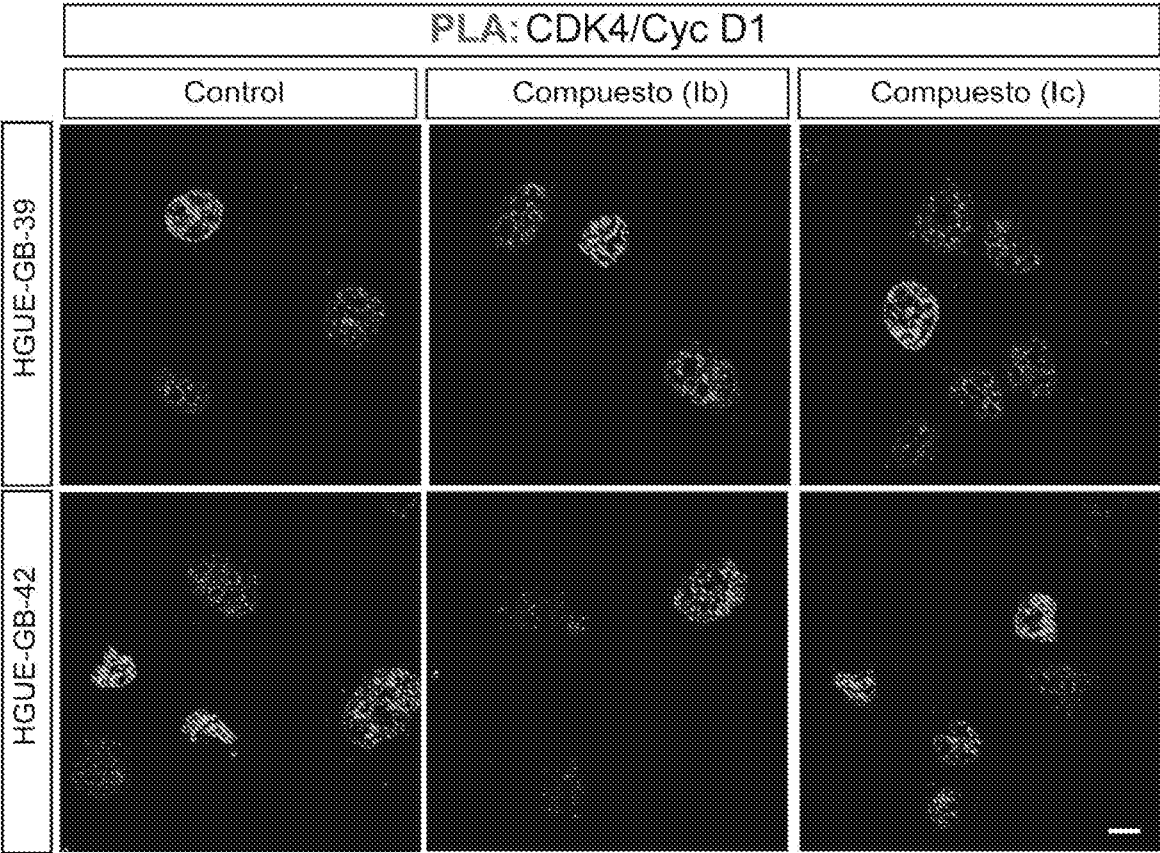


Figura 7B



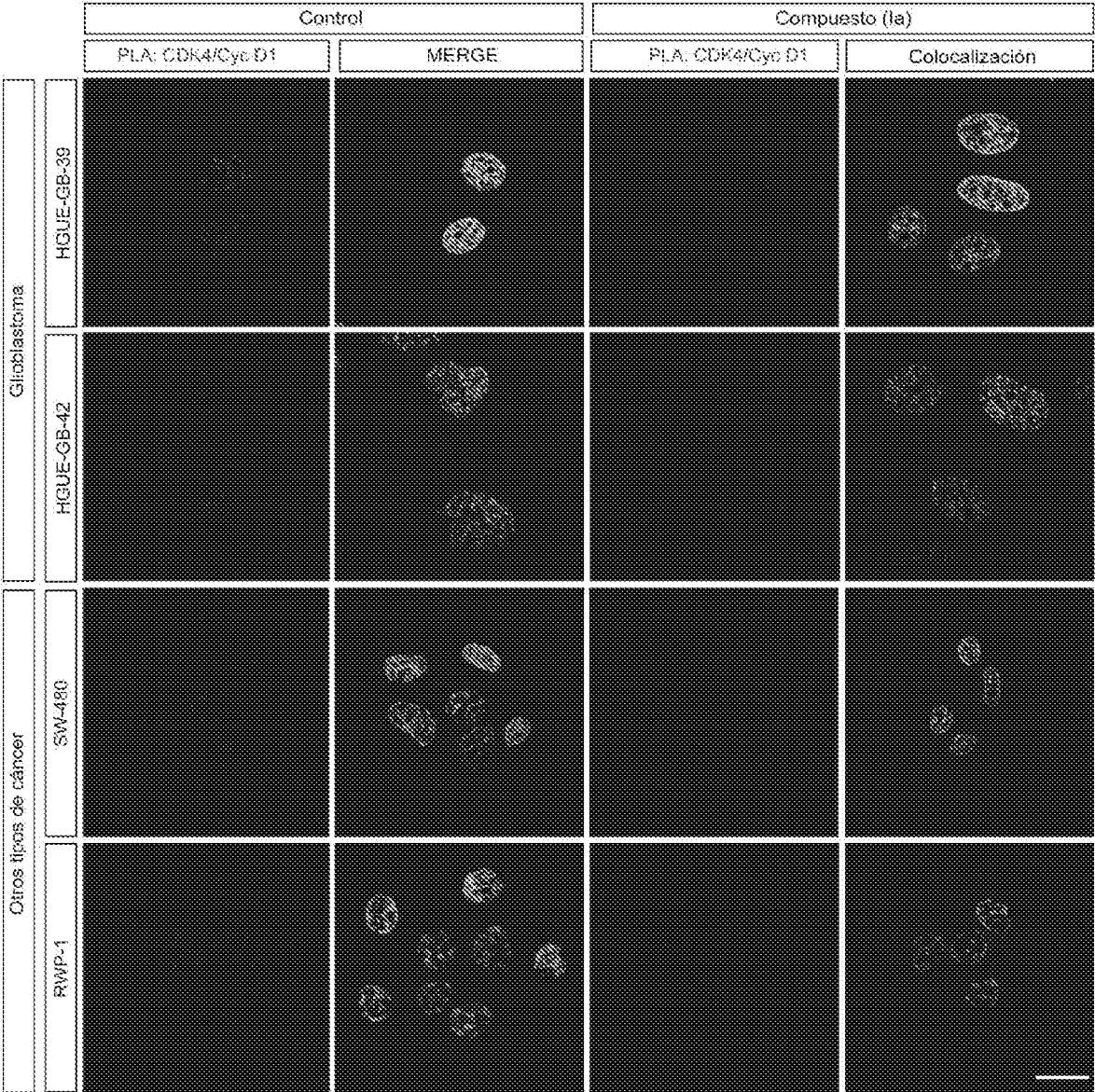


Figura 7A

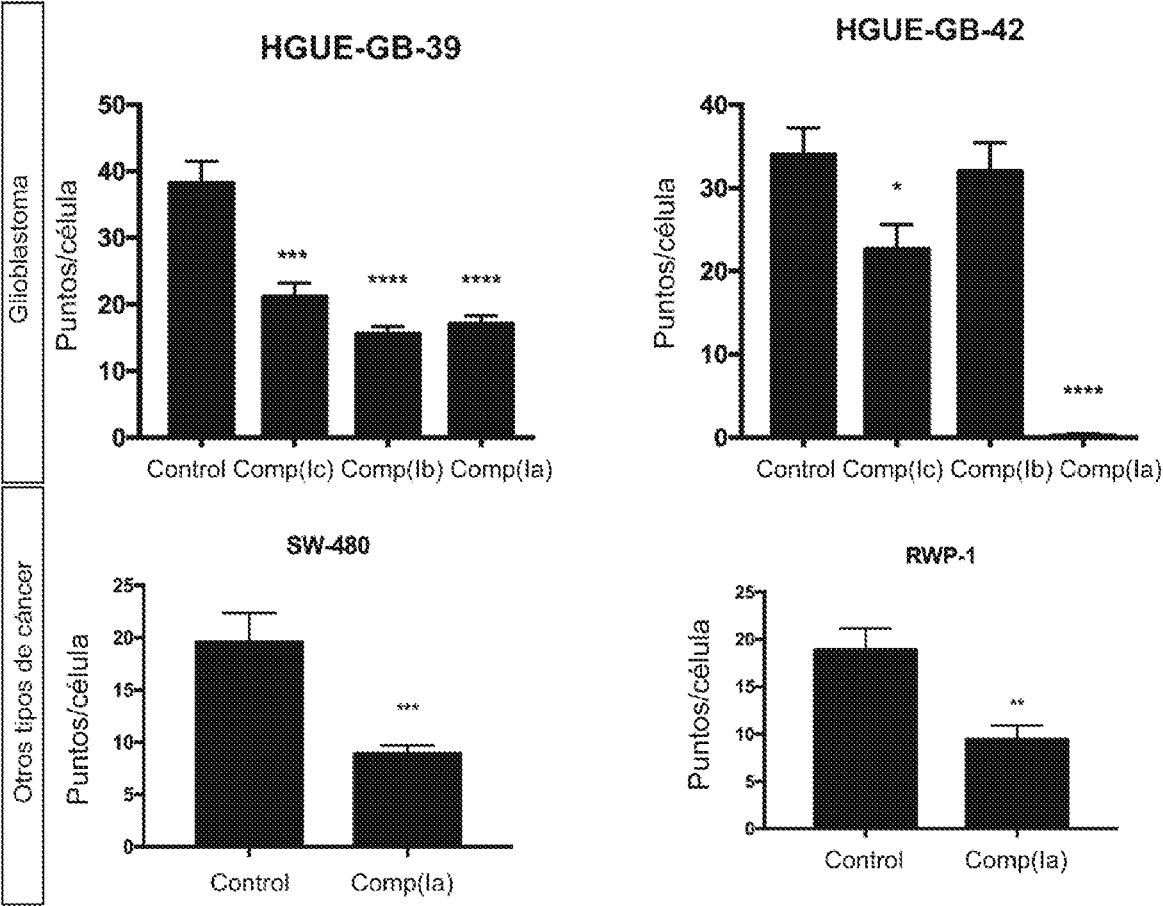


Figura 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2025/070406

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K31/4035** (2006.01)

**A61P35/00** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Ansera based SEARCH, REGISTRY, HCAPLUS, INVENES

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DataBase REGISTRY, compuesto con RN 339340-83-9, introducido in the DataBase REGISTRY of STN: 05 Jun 2001 and referencias in base of datos Chemcats. . 05 Jun 2001.	1-15
A	DataBase REGISTRY, compuesto con RN 351188-21-1, introducido in the DataBase REGISTRY of STN: 13 August 2001y referencias in base of datos CHEMCATS. 13.08.2001.	1-15
A	DataBase REGISTRY, compuesto con RN 1267530-08-4, introducido in the DataBase REGISTRY of STN: 10 Mar 2011 and referencia in base of datos Chemical Abstract.	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05/09/2025

Date of mailing of the international search report  
(17/09/2025)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
E. Albarrán Gómez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 913493038

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2025/070406

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARTÍNEZ-GARCIA M. et al.. SEOM Clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma (2017). Clinical And Translational Oncology. Springer International Publishing., 30/10/2017, Vol. 20, N° 1, pages 22-28, ISSN 1699-048X, ISSN 1699-3055 (electronic), <DOI: 10.1007/s12094-017-1763-6> the whole document	1-15
A	LIM JOLINE S.J. et al.. CDK4/6 Inhibitors: Promising Opportunities beyond Breast Cancer. Cancer Discovery. American Association For Cancer Research., 30/06/2016, Vol. 6, N° 7, pages 697-699, ISSN 2159-8274, <DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0563> The whole document.	1-15
A	US 2021179585 A1 (SHENG XIAOHONG et al.) 17/06/2021, todo el documento	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2025/070406

### Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2021179585 A1	17.06.2021	WO2019200502 A1 CN111801323 A	24.10.2019 20.10.2020
-----	-----	-----	-----

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2025/070406

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/4035** (2006.01)

**A61P35/00** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Ansera based SEARCH, REGISTRY, HCAPLUS, INVENES

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	Base de datos REGISTRY, compuesto con RN 339340-83-9, introducido en la base de datos REGISTRY de STN: 05 Jun 2001 y referencias en base de datos Chemcats. . 05 Jun 2001.	1-15
A	Base de datos REGISTRY, compuesto con RN 351188-21-1, introducido en la base de datos REGISTRY de STN: 13 August 2001y referencias en base de datos CHEMCATS. 13.08.2001.	1-15
A	Base de datos REGISTRY, compuesto con RN 1267530-08-4, introducido en la base de datos REGISTRY de STN: 10 Mar 2011 y referencia en base de datos Chemical Abstract.	1-15

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**05/09/2025**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**17 de septiembre de 2025 (17/09/2025)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
E. Albarrán Gómez  
Nº de teléfono 913493038

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2025/070406

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	MARTÍNEZ-GARCIA M. et al.. SEOM Clinical guidelines for diagnosis and treatment of glioblastoma (2017). Clinical And Translational Oncology. Springer International Publishing., 30/10/2017, Vol. 20, Nº 1, páginas 22-28, ISSN 1699-048X, ISSN 1699-3055 (electronic), <DOI: 10.1007/s12094-017-1763-6> todo el documento	1-15
A	LIM JOLINE S.J. et al.. CDK4/6 Inhibitors: Promising Opportunities beyond Breast Cancer. Cancer Discovery. American Association For Cancer Research., 30/06/2016, Vol. 6, Nº 7, páginas 697-699, ISSN 2159-8274, <DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0563> todo el documento.	1-15
A	US 2021179585 A1 (SHENG XIAOHONG et al.) 17/06/2021, todo el documento	1-15

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

### Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2025/070406

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes			
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2021179585 A1	17.06.2021	WO2019200502 A1	24.10.2019
-----	-----	CN111801323 A	20.10.2020
-----	-----	-----	-----