



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 657**

51 Int. Cl.:
A61K 31/505 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07759007 .3**
96 Fecha de presentación : **21.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2010181**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Método de tratamiento de trastornos celulares proliferativos por utilización de compuestos de pirimidinamina.**

30 Prioridad: **18.04.2006 US 407233**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

73 Titular/es: **RIGEL PHARMACEUTICALS, Inc.**
1180 Veterans Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es: **Masuda, Esteban;**
Payan, Donald, G. y
Grossbard, Elliott, B.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 364 657 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

Métodos de tratamiento de trastornos celulares proliferativos por utilización de compuestos de pirimidinadiamina.

5 2. CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere a métodos y composiciones para tratamiento de trastornos celulares proliferativos, en los cuales las composiciones comprenden inhibidores que están dirigidos a actividades de quinasas que afectan al potencial proliferativo de las células.

10

3. ANTECEDENTES

El crecimiento celular incontrolado es el sello de los tumores y cánceres y de otros trastornos celulares proliferativos. Los procesos celulares que controlan la división celular y la proliferación celular son complejos, implicando una interacción complicada entre productos génicos que promueven la división y el crecimiento celulares y aquéllos que controlan tales procesos. Los reguladores positivos del crecimiento y la proliferación se describen generalmente como proto-oncogenes, que son las contrapartidas normales de los genes alterados y sus productos génicos conocidos que promueven la formación de tumores y cánceres. Los proto-oncogenes promueven la división celular y controlan negativamente la apoptosis celular. El desacoplamiento de la actividad de estos productos génicos de su estado regulado normal convierte los proto-oncogenes en oncogenes. La función normal de los proto-oncogenes incluye factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, moléculas de transducción de señales celulares, y factores nucleares. La activación de los proto-oncogenes en formas oncogénicas puede producirse de una diversidad de maneras, que incluyen mutación génica, amplificación, translocación génica, y activación viral.

15

20

25

30

35

Los supresores de tumores, en oposición a los proto-oncogenes, ejercen generalmente un efecto negativo sobre el crecimiento celular, promueven la apoptosis de las células, inhiben la progresión del ciclo celular, y afectan al potencial invasivo y metastásico. En algunos casos, los supresores de tumores pueden contrarrestar la actividad de los oncogenes incluso en sus formas alteradas. Por pérdida de inhibición de la función de los supresores de tumores, la actividad incontrolada de los proto-oncogenes o sus formas oncogénicas correspondientes conduce a la transformación celular y la carcinogénesis. La mutación o delección génica, la transcripción suprimida, la degradación incrementada, o anomalías de proteínas asociadas que operan en concierto con los supresores de tumores pueden poner en compromiso la actividad de los supresores de tumores. Los genes supresores de tumores actúan como alelos recesivos de tal modo que una célula con un alelo normal junto con un alelo mutante se comporta todavía normalmente. Así, la pérdida del alelo normal, denominada también pérdida de la heterocigosidad (LOH), caracteriza algunos tipos de crecimiento y proliferación anormal de células. La inestabilidad genómica que se presenta como consecuencia de la actividad de los oncogenes y la disrupción de los controles de la división celular normal pueden aumentar la probabilidad de LOH y por consiguiente la aparición del fenotipo transformado por los oncogenes.

40

45

50

El tratamiento de los trastornos celulares proliferativos puede dirigir los oncogenes y/o los supresores de tumores afectados en las células transformadas. Sin embargo, un trastorno que surge por una pérdida de función, tal como un supresor de tumores, es típicamente más problemático cuando se intenta tratar el defecto molecular subyacente que el tratamiento del defecto molecular subyacente en un trastorno que surge como consecuencia de un cambio con ganancia de función, tal como la activación de un oncogén. La alteración de los procesos celulares para proporcionar la función celular perdida no es practicable en muchos casos. Así, incluso para trastornos celulares proliferativos que surgen como consecuencia de la pérdida de actividad de supresores de tumores, la terapia se dirige típicamente a las moléculas disreguladas (v.g., proto-oncogenes) que actúan como consecuencia de la función perdida del supresor de tumor. Aunque se han identificado muchas dianas moleculares, tales como proteína-quinasas no basadas en receptores y basadas en receptores, la naturaleza compleja de los mecanismos reguladores celulares en juego durante la proliferación y el crecimiento celular indicarían que otras moléculas que podrían ser dianas de la terapia siguen sin ser identificadas. Algunas de éstas serán desconocidas, mientras que otras pueden ser conocidas pero no estar ligadas a trastornos celulares proliferativos.

55

Así pues, es deseable identificar otras moléculas celulares que actúen de una manera oncogénica en trastornos de proliferación celular, sea como consecuencia de alteración de su propia actividad o como resultado de la pérdida de una función celular que actúe para regular su actividad. Por identificación de tales moléculas, pueden identificarse y utilizarse compuestos dirigidos específicamente a dicha molécula celular, sea independientemente o en combinación con otras terapias conocidas, para tratar el trastorno celular proliferativo.

60

WO-A-03/040141 describe compuestos de oxazolil-fenil-2,4-diamino-pirimidina y métodos para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos.

WO-A-2005/027848 describe métodos para cribado de compuestos osteogénicos dirigidos a la quinasa Syk y/o a Vav3 y los usos de moduladores Syk y/o moduladores Vav.

WO-A-03/055489 describe compuestos derivados de 2,4-diamino-pirimidina como inhibidores de la prolil-peptidasa, inductores de apoptosis y agentes de tratamiento del cáncer.

WO-A-2004/087698 describe tiazoles útiles como inhibidores de proteína-quinasas.

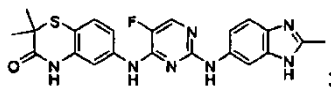
5

4. SUMARIO

La presente invención proporciona un compuesto que es un compuesto inhibidor de la quinasa Syk para uso en el tratamiento de un trastorno celular proliferativo, en el cual el compuesto es

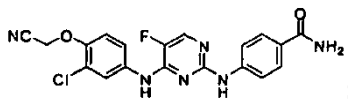
10

(a) N2-(2-metil-1-benzo[d]imidazol-6-il)-N4-(2,2-dimetil-3(4H)-oxo-2H-benzo[b][1,4]tiazin-3(4H)-ona-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina



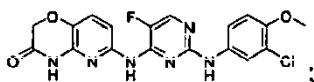
15

(b) N2-(4-carbamoilfenil)-N4-[3-cloro-4-cianometoxi-fenil]-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina



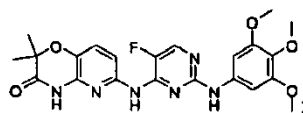
20

(c) N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinadiamina



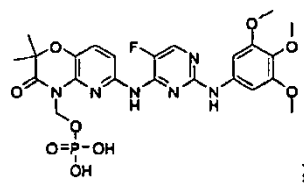
25

(d) N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina



30

(e) (N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogeno-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina)



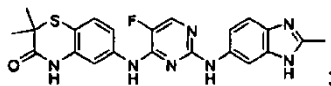
o una sal, hidrato, solvato, o N-óxido de los mismos.

35

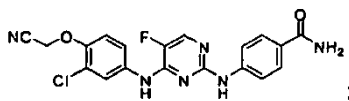
La presente invención proporciona también un compuesto que es un compuesto inhibidor de la quinasa Syk para uso en la inhibición de la metástasis de tumores, en donde el compuesto es

40

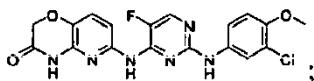
(a) N2-(2-metil-1-benzo[d]imidazol-6-il)-N4-(2,2-dimetil-3(4H)-oxo-2H-benzo[b][1,4]tiazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina



(b) N2-(4-carbamoilfenil)-N4-[3-cloro-4-cianometoxi-fenil]-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina

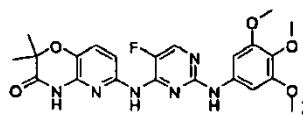


(c) N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinadiamina



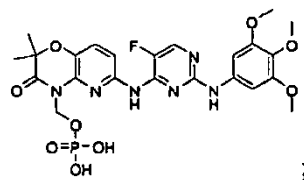
5

(d) N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina



10

(e) (N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogeno-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina)



15

o una sal, hidrato, solvato, o N-óxido de los mismos.

En algunas realizaciones, el inhibidor de la quinasa Syk es selectivo para la quinasa Syk, estando por tanto dirigido específicamente a la actividad aberrante de la quinasa Syk presente en el trastorno proliferativo. Cualquier trastorno celular proliferativo en el cual Syk juegue un papel en cierto aspecto de la división anormal de las células o el crecimiento celular puede tratarse con los compuestos inhibidores. En algunas realizaciones, los trastornos celulares proliferativos que pueden tratarse con los compuestos inhibidores son neoplasmas hematopoyéticos, que son crecimientos anormales que implican las células del linaje hematopoyético. Neoplasmas hematopoyéticos que pueden tratarse con los compuestos inhibidores de Syk incluyen, entre otros, diversos neoplasmas mieloides y linfoides, tales como leucemia mielógena crónica, linfoma de Burkitt, y leucemia mielógena aguda.

En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor de la quinasa Syk comprende un compuesto inhibidor de las quinasas Syk/Flt-3, capaz de inhibir la actividad tanto de la quinasa Syk como de la quinasa Flt-3. Estos compuestos pueden utilizarse para tratar trastornos celulares proliferativos que están asociados con la actividad aberrante de la quinasa Flt-3. Diversos neoplasmas hematopoyéticos en los cuales la actividad de Flt-3 es anormal incluyen, entre otros, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de las células B-precursoras, leucemia linfoblástica aguda de las células T, síndrome mielodisplástico, y leucemia mielógena crónica. Estos trastornos y otros trastornos de esta clase que implican Flt-3 pueden tratarse con los compuestos inhibidores de Syk/Flt-3 tales como miembros de los compuestos de 2,4-pirimidinadiamina descritos en esta memoria.

En otros aspectos, los compuestos inhibidores están pensados para ser utilizados en un método para tratamiento de tumores mediados por genes virales se transforman una célula normal en una célula tumoral. En estas realizaciones, los tumores en los cuales la actividad de un oncogén viral destruye la función de la quinasa Syk como parte de su mecanismo de transformación pueden considerarse como dianas para tratamiento. Así, en algunas realizaciones, tumores mediados por virus están asociados con infección por virus que llevan genes que codifican proteínas con motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). Normalmente, estas secuencias conservadas modulan la actividad de la quinasa Syk durante el desarrollo y la función de las células del sistema inmunitario (v.g., células B, células T, neutrófilos, etc.). Sin embargo, la expresión persistente de proteínas virales con secuencias ITAM puede conducir a una actividad aberrante de la quinasa Syk y a la formación y/o mantenimiento consiguientes de tumores. En diversas realizaciones, los tumores mediados por virus pueden estar asociados con el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, el virus Epstein-Barr, el virus linfotrópico de las células T humanas (HTLV-1), o el virus del tumor mamario (MTV). La presencia de estos virus está correlacionada con cierto número de trastornos celulares proliferativos, que incluyen, sarcoma de Kaposi, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, leucemia de las células T adultas, y ciertas formas de cáncer de mama.

En algunos aspectos, los compuestos están destinados a ser utilizados en un método de inhibición de metástasis tumorales por administración a un individuo de una cantidad de un compuesto inhibidor de Syk eficaz para inhibir la metástasis tumoral. Cualquier tumor con potencial metastásico puede tratarse con los compuestos inhibidores. En algunas realizaciones, la metástasis tumoral está asociada con la actividad de integrinas, que pueden actuar a través de la quinasa Syk en la modulación de las propiedades adhesivas de las células, tales como la observada en la metástasis de las células tumorales. Los inhibidores de la quinasa Syk pueden utilizarse para inhibir la metástasis de tumores por afectar a los eventos de señalización celular mediados por integrinas, tales como las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$, y/o $\beta 3$.

En algunos aspectos, los compuestos inhibidores están destinados a ser utilizados en un método en combinación con otros tratamientos del cáncer. En algunas realizaciones, los compuestos inhibidores de Syk están destinados a ser utilizados en un método en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, que incluyen, entre otros, antimetabolitos, agentes alquilantes, compuestos de coordinación, inhibidores de la transcripción, inhibidores de topoisomerasas, compuestos que se fijan a la hendidura menor del DNA, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, hormonas, y encimas antitumorales.

5. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1A, FIG. 1B, y FIG. 1C muestran la aptitud del compuesto VI inhibidor de Syk para bloquear la proliferación e inducir la diferenciación de células TEL-Syk-transformadas. El contenido de DNA de las células transformadas por TEL-Syk o transformadas por BCRAb1 tratadas durante 36 horas con DMSO, el compuesto VI inhibidor de Syk (2 μM) o el inhibidor STI-571 de la quinasa Abl (2 μM) se muestran en FIG. 1A. La aptitud de TEL-Syk para bloquear la diferenciación de las células pre-B se muestra en FIG. 1B. Las células se cultivaron durante 3 días en ausencia de IL-7 y se analizaron respecto a la expresión de kappa LC por FACS. La inhibición de la actividad de TEL-Syk con el compuesto VI se muestra en FIG. 1C.

FIG. 2A y FIG. 2B muestran la aptitud del inhibidor VI de Syk para bloquear la proliferación de las células pre-B transformadas con Myc. FIG. 2A es un perfil FACS de células pre-B que se habían transducido con vectores de expresión Myc y cultivado en ausencia de IL-7 durante una semana. El panel inferior de FIG. 2B muestra bazo de ratones RAG/ γC +/- 5 semanas después de la inyección con las células indicadas, ilustrando la aptitud de las células transformadas con Myc para causar esplenomegalia y leucemia. FIG. 2B muestra el contenido de DNA de células transformadas con Myc que se trataron durante 36 horas con DMSO, VI (2 μM) o STI-571 (2 μM).

FIG. 3A y FIG. 3B muestran la aptitud del inhibidor VI de Syk para bloquear la proliferación de líneas de células tumorígenas pre-B SLP-65^{-/-}. FIG. 3A muestra que las líneas de células pre-B SLP-65^{-/-} pueden causar esplenomegalia y leucemia, como se evidencia por el estado de los bazo de ratones RAF/ γC ^{-/-} 5 semanas después de la inyección con las células indicadas. FIG. 3 muestra el contenido de DNA de las líneas de células pre-B tumorígenas SLP-65^{-/-} que se trataron durante 36 horas con DMSO, VI (2 μM) o STI-571 (2 μM).

FIG. 4 muestra curvas de supervivencia para ratones NOD-SCID inoculados por vía intravenosa (i.v.) con células de leucemia mieloide aguda humana MV4-11 y tratados con el compuesto VII a 40 mg/kg dos veces al día, PO, desde el día 17 después de la inoculación de las células tumorales durante toda la duración del estudio. Los cálculos para % ILS para el grupo VII tratado con 40 mg/kg (10⁶ células) suponen un día mediano de muerte de 83 días, debido a una supervivencia mayor que 50% en este grupo a la finalización del estudio (día 83).

FIG. 5 muestra los días hasta la muerte para animales individuales. Los datos de supervivencia corresponden a ratones NOD-SCID inyectados por vía intravenosa con células tumorales MV4-11. Los ratones se trataron con vehículo o dosis variables de VII dos veces al día, PO, desde el día 17 después de la inyección de las células tumorales hasta el final del estudio (día 83). Los días hasta morir para los animales sacrificados se muestran en el gráfico con el día mediano de muerte designado por una línea azul. Los supervivientes en cada grupo a la finalización del estudio se muestran en la parte superior del gráfico designados como #supervivientes/# ratones totales.

FIG. 6A y FIG. 6B muestran la frecuencia de tumores en ratones NOD-SCID portadores de tumor MV4-11 en la necropsia. La gravedad de la enfermedad se evaluó cuantificando la frecuencia de los ratones que tenían tumores palpables en la necropsia a la finalización, con indiferencia de la razón para el sacrificio (FIG. 6A). El número total de tumores por grupo se muestra en FIG. 6B. Los ratones se inocularon por vía i.v. con 5 o 10 millones de células AML humanas MV4-11 (designadas como 5E6 o 10E6, respectivamente). El día 17 después de la inyección de las células, se trataron los ratones con vehículo o 40 mg/kg de VII (PO, dos veces al día) hasta el sacrificio o durante toda la duración del estudio, hasta el día 83 para los animales supervivientes. Los ratones se sacrificaron y se realizó una necropsia exhaustiva. El número total de necropsias realizadas por grupo está comprendido entre 8 y 13 animales.

FIG. 7 muestra el perfil de distribución de tumores de los animales experimentales. El porcentajes de tumores totales encontrado en diversas localizaciones anatómicas se observó por necropsia después del sacrificio. Los ratones se inyectaron i.v. con 5 o 10 millones de células MV4-11 y se dosificaron por vía oral con vehículo o 40 mg/kg de VII

dos veces al día durante toda la duración del estudio. Los animales que exhibían glándulas salivares engrosadas se incluyen en el gráfico, aunque no se detectó tumor palpable alguno. El número total de necropsias realizadas por grupo estaba comprendido entre 8 y 13 animales.

5 FIG. 8 muestra el perfil de injerto de células tumorales MV4-11 en la médula ósea (BM) y la sangre periférica (PB) de ratones NOD-SCID. Los datos corresponden al injerto de células tumorales humanas MV4-11 en ratones NOD-SCID
10 tratados con vehículo o con 40 mg/kg de **VII** dos veces al día, PO, desde el día 17 después de la inyección de las células tumorales después de inyección i.v. de las células tumorales hasta el final del estudio. El injerto de las células tumorales en la médula ósea (BM) y la sangre periférica (PB) se detectó mediante análisis por citometría de flujo utilizando tinción superficial de las células CD33 y HLA para detección de las células tumorales MV4-11. Se normalizaron los datos, y se calcularon los porcentajes de células tumorales humanas referidos a células totales. Las células totales se definieron como el número de eventos humanos CD33 + HLA + positivos y eventos de tinción positivos CD45 murinos. El gráfico incluye todas las muestras.

15 FIG. 9 muestra la detección de Flt-3 en aloinjertos de MV4-11 por inmunoprecipitación y análisis por transferencia Western. El panel A es la detección de Flt-3 fosforilada en lisados de tumores MV4-11 de ratones aproximadamente 2 horas después de la dosis final de **VII** o vehículo utilizando anticuerpo anti-fosfotirosina en el lado de la izquierda del gráfico y anticuerpo anti-fosfo-Flt-3 específico en el lado de la derecha de la transferencia. Adicionalmente, se muestra en el panel B una re-exploración de la transferencia para los niveles totales de Flt-3.

20 FIG. 10 muestra un análisis de histona H3 fosforilada de aloinjertos de tumores MV4-11. La proliferación se evaluó *ex vivo* en secciones de tumores fijadas con formalina de tres ratones de este estudio seleccionados aleatoriamente utilizando tinción inmunohistoquímica de histona fosforilada H3 específica humana (pH3) como marcador para la proliferación de células tumorales. La expresión de pH3 humana se redujo en las secciones de tumor de una manera dependiente de la dosis después del tratamiento con **VII**. Cuando se comparó con aloinjertos de tumores MV4-11 de ratones tratados con vehículo, el tratamiento con 20 y 40 mg/kg de **VII** dio como resultado una inhibición del 53% y 71% de pH3, respectivamente. Estos datos indican que la inhibición mediada por **VII** reducía la capacidad proliferativa de los tumores MV4-11 *in vivo*, en correlación con los volúmenes reducidos de tumor observados durante la parte en vivo del estudio. La proliferación reducida se debe probablemente a una fosforilación constitutiva de Flt-3 reducida, dado que se ha demostrado que esta actividad es necesaria para la supervivencia de las células MV4-11 *in vitro*.

25 FIG. 11 muestra datos representativos que ilustran la tinción inmunohistoquímica para pErk1/2 y pStat5 en secciones tumorales de ratones portadores de tumores MV4-11 tratados por vía oral 2 veces al día durante 26 días. Los tumores se recogieron de los ratones -2 horas después de la dosis final de vehículo o 40 mg/kg de **VII**.

30 FIG. 12 muestra el efecto del tratamiento de células AML o transfectantes 32D con **VI** 1 μ M de en la inducción de la apoptosis como se determina por tinción con Annexina V y PI.

40 6. DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

6.1 Métodos de Tratamiento

45 La presente exposición describe un método de tratamiento de trastornos celulares proliferativos por administración de compuestos inhibidores de la quinasa Syk o las quinasas Syk/Flt-3. Las quinasas Syk son uno de los dos miembros conocidos de la familia de tirosina-quinasas no receptoras Syk (Syk y ZAP-70). Syk se activa por la fijación de sus dominios de homología src 2 (SH2) a motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). La quinasa Syk juega un papel esencial en el desarrollo de los linfocitos y la activación de células inmunitarias, y se caracteriza óptimamente por su papel en la señalización de receptores de las células B y la liberación de mastocitos mediada por receptores Fc de gránulos. Aunque se expresa ubicuamente en las células hematopoyéticas, Syk se expresa también en otros tejidos, tales como células epiteliales de mama y hepatocitos. Algunos investigadores en este campo creen que Syk es un supresor de tumores y actúa como regulador negativo del potencial metastásico. Se ha sugerido que la pérdida de actividad de Syk está asociada con la formación de cáncer de mama invasivo, y se ha indicado una pérdida cromosómica del gen Syk en ciertos tipos de metástasis del cáncer de mama primario en ganglios linfáticos. Así pues, el uso de inhibidores de Syk para tratar trastornos celulares proliferativos o como tratamiento para reducir el potencial metastásico de las células tumorales podría estar contraindicado si Syk funciona como un supresor de tumores.

60 Flt-3 es también una tirosina-quinasa, pero al contrario de Syk, pertenece a la familia de proteínas receptoras de tirosina-quinasas. Flt-3 es un miembro de las tirosinas-quinasas receptoras de la clase III, que son afines por secuencia de aminoácidos y características estructurales. Flt-3 se activa por fijación a su ligando cognado, Flt-3 L. La quinasa Flt-3 se expresa en las células madre hematopoyéticas precoces de la médula ósea normal, y parece intervenir en el desarrollo de las células madre pluripotentes y las células B por control de la actividad de diversas dianas celulares aguas abajo que incluyen, entre otras, fosfolipasa C- (PLC), la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3'-quinasa (PI3K), Shc, Shp-2, Ship, Grb2, Vav, quinasa Fyn, quinasa Src, la proteína de transducción de señales

Stat5, y Erk. Aunque la quinasa Flt-3 se expresa normalmente en las células progenitoras de la médula ósea, se observan también niveles de expresión altos en un espectro de trastornos proliferativos de células hematológicas, tales como la leucemia mielógena aguda (AML), la leucemia linfoblástica aguda de las células precursoras B, la leucemia linfoblástica aguda de las células T, y la leucemia mielógena crónica (CML) en la crisis de blastos linfoides (véase, v.g., Rosnet et al., 1996, *Leukemia* 10: 238-248; Carow et al., 1996, *Blood* 87: 1089-1096). La presencia de mutaciones Flt-3 en trastornos proliferativos de células hematológicas está correlacionada con tasas de remisión reducidas, aumentos en las tasas de relapso, y tasas de supervivencia global generalmente menores (Rombouts et al., 2000, *Leukemia* 14:675-683; Thiede et al., 2002, *Blood* 99:4326-4335; Frohling et al., 2002, *Blood* 100:4372-4380).

Aunque la técnica sugiere que Syk puede actuar como supresor de tumores, la presente exposición está basada en indicaciones de que Syk funciona contrariamente a dicho papel propuesto. Por ejemplo, la expresión forzada de la quinasa Syk en células tumorales no parece invertir el fenotipo transformado de las células tumorales. Por el contrario, se sugiere en esta memoria que Syk actúa con capacidad oncogénica para promover y/o mantener la proliferación celular. Con esta perspectiva acerca del papel de Syk, la descripción proporciona compuestos para uso en un método de tratamiento de trastornos celulares proliferativos por administración a un individuo de una cantidad de un compuesto inhibidor de la quinasa Syk eficaz para tratar un trastorno celular proliferativo.

Además, se demuestra en esta memoria que algunos compuestos inhibidores de Syk, tales como miembros de los compuestos de 2,4-pirimidinadiamina descritos con detalle más adelante, pueden actuar también como inhibidores de la quinasa Flt-3. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los compuestos inhibidores de Syk con este perfil inhibidor de acción dual o múltiple de inhibición tanto de la quinasa Flt-3 como de la quinasa Syk (*es decir*, actividades inhibitoras de las quinasas Syk/FLT-3) encuentran aplicaciones para tratamiento de trastornos celulares proliferativos asociados con la actividad aberrante de la quinasa receptora Flt-3. La asociación de ambas quinasas Syk y Flt-3 con el desarrollo de las células hematopoyéticas respalda el uso de tales compuestos inhibidores de las quinasas Syk/Flt-3 para tratamiento de neoplasmas hematopoyéticos.

En las descripciones de los métodos de esta memoria, los términos utilizados tendrán su significado ordinario y común, a no ser que se definan específicamente de otro modo en esta memoria.

"Syk" o "quinasa Syk" se refiere a la proteína tirosina-quinasa del bazo (citoplásmica) no receptora 72 kDa expresada en las células B y otras células hematopoyéticas. La quinasa Syk se caracteriza por dos dominios de consenso Src-homología 2 (SH2) en tándem que se fijan a motivos de activación fosforilados de inmunorreceptores basados en tirosina ("ITAMs"), un dominio "enlazador" y un dominio catalítico (para una revisión, véase Sada et al., 2001, *J. Biochem. (Tokio)* 130:177-186 así como Turner et al., 2000, *Immunology Today* 21:148-154 y Wong et al., 2004, *Expert Opin Investig Drugs* 13(7):743-62.). La quinasa Syk es crítica también para la fosforilación por tirosina de proteínas múltiples que regulan caminos importantes conducentes a inmunorreceptores, tales como la movilización de Ca²⁺ y cascadas de proteína-quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y desgranulación. La quinasa Syk juega también un papel crítico en la señalización de integrinas en los neutrófilos (véase, v.g., Mocsai et al. 2002, *Immunity* 16: 547-558). La quinasa Syk incluye quinasas de especies de animales cualesquiera, con inclusión, pero sin carácter limitante, de homo sapiens, simios, bovinos, porcinos, roedores, etc., reconocidas como pertenecientes a la familia Syk. Se incluyen específicamente isoformas, variantes de corte y empalme, variantes alélicas y mutantes, tanto existentes naturalmente como artificiales. Las secuencias de aminoácidos de tales quinasas Syk están disponibles de GENBANK. Ejemplos específicos de mRNAs que codifican diferentes isoformas de la quinasa Syk humana, están disponibles en GENBANK, No. de Acceso gij|21361552|ref|NM_003177.2, gij|496899|emb|Z29630.1|HSSYKPTK[496899] and gij|1503058|gb|BC011399.1|BC011399[15030258], que se incorporan en esta memoria por referencia.

"Flt-3" o "tirosina-quinasa receptora Flt-3" se refiere a una tirosina-quinasa receptora que fija el ligando flt-3 (Flt-3 L o FL). Flt-3 es conocida también como tirosina-quinasa 3 afín a Fms, FLK-2 (quinasa 2 de hígado fetal) y STK-1 (quinasa-11 de las células madre humanas) (véase, v.g., Mathews et al., 1991, *Cell*, 65: 1143-1152; Rosnet et al., 1991, *Oncogene*, 6: 1641-1650). Flt-3 tiene semejanza de secuencia con miembros de la familia de las tirosina-quinasa receptoras de clase III (RTKIII), un subconjunto de las cuales incluye, entre otras, FMS, receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), y Kit (Rosnet et al., 1993, *Crit. Rev. Oncog.*, 4: 595-613). El polipéptido Flt-3 en ratones y humanos es una proteína de 1000 y 993 aminoácidos, respectivamente, y se sabe que se expresa en células hematopoyéticas inmaduras, placenta, gónadas, y cerebro. Como se ha indicado arriba, Flt-3 tiene un papel supuesto en el desarrollo de las células madre pluripotentes y las células B. Análogamente a otros miembros de las tirosina-quinasa-receptoras de clase III, Flt-3 se caracteriza por 5 repeticiones semejantes a inmunoglobulina en el dominio extracelular, un dominio transmembranal (TM), un dominio yuxtamembranal (JM), dos dominios intracelulares de tirosina-quinasa (TK1 y TK2) separados por una inserción de quinasa (KI) humana, y un dominio de término C (Agnes et al., 1994, *Gene* 145: 283-288; 2004, Griffith et al., *Molecular Cell* 13: 169-118). La quinasa Flt-3 incluye quinasas de cualquier especie animal, con inclusión pero sin carácter limitante de homo sapiens, simio, bovino, porcino, roedor, etc., reconocido como perteneciente a la familia de receptores Flt-3. Se incluyen específicamente isoformas, variantes de corte y empalme, variantes alélicas y mutantes, tanto existentes naturalmente como artificiales. Las secuencias de aminoácidos de tales quinasas Syk están asequibles de GENBANK®. Ejemplos espe-

cíficos de tales secuencias de ácido nucleico y las secuencias correspondientes de aminoácidos de diferentes quinasas Flt-3 incluyen, entre otras, humanas (Núm. de Acceso NM_004119.1), de chimpancé (Núms. de Acceso 452508; XM_509601.1; XP_509601.1), de perro (NM_001020811.1; NP_001018647.1), y de ratón (Núms. de Acceso 142551; NM_010229.11; NP_034359.11; AK0458654; AK1492924; AK1636404; BC1090034; BC1090044; L361634; M646894; X593984), que se incorporan en esta memoria por referencia.

Algunas realizaciones de variantes de Flt-3 están asociadas con ciertos trastornos proliferativos de las células hematopoyéticas. "Flt-3 ITD" se refiere a una variante de Flt-3 que tiene duplicaciones internas en tándem (ITDs) en el dominio yuxtamembranal (JM) (NaKao et al., 1996, *Leukemia* 10: 1911-1918; Griffith et al., *supra*). El número de dominios JM duplicados en Flt-3 ITD varía de un individuo a otro, pero se encuentran en marco y generalmente dan como resultado una proteína con una actividad de tirosina-quinasa aberrante (es decir, incrementada). Variantes del tipo Flt-3 TTD están asociadas en muchos casos con leucemia mielógena aguda y síndrome mielodisplásico. Otro tipo de variantes son las "mutaciones en bucle de activación Flt-3", que se refieren a variantes que tienen un cambio en la secuencia de aminoácidos (en comparación con el tipo salvaje) en el bucle de activación del segundo dominio de tirosina-quinasa (TK2). Sin quedar limitados por la teoría, el bucle de activación parece funcionar como bloqueante del acceso de adenosina-trifosfato (ATP) y sustrato al dominio que quinasa, y ejerce por tanto un efecto inhibitorio sobre la quinasa. Como consecuencia, la activación de las mutaciones de bucle puede dar lugar a formas de quinasa Flt-3 con actividad constitutiva. Una variante ilustrativa de bucle de activación es D835A, que se observa en la leucemia mielógena aguda, el síndrome mielodisplásico, y la leucemia linfoblástica aguda (Yamamoto et al., 2001, *Blood* 197: 1154. Griffin J.D., 2001, *Blood* 97: 2193a). Otras variaciones de bucle de activación ilustrativas asociadas con trastornos celulares proliferativos en humanos incluían, entre otras, D835Y, D835A, D835E, D835H, D835N, D835V, D835del, e I833del.

"Trastorno celular proliferativo" se refiere a un trastorno caracterizado por proliferación anormal de las células. Un trastorno proliferativo no implica limitación alguna con respecto a la tasa de crecimiento celular, sino que indica meramente pérdida de los controles normales que afectan al crecimiento y la división de la célula. Así, en ciertas realizaciones, las células de un trastorno proliferativo pueden tener las mismas tasas de división que las células normales, pero no responden a las señales que alimentan dicho crecimiento. Dentro del ámbito de "trastorno celular proliferativo" se encuentra un neoplasma o tumor, que es un crecimiento anormal de tejido. El cáncer se refiere a cualquiera de los diversos neoplasmas malignos caracterizados por la proliferación de células que tienen la capacidad de invadir el tejido circundante y/o producir metástasis en sitios de colonización nuevos.

"Neoplasma hematopoyético" se refiere a un trastorno celular proliferativo que surge de células de linaje hematopoyético. Generalmente, la hematopoyesis es el proceso fisiológico por el cual se desarrollan células no diferenciadas o células madre en diversas células encontradas en la sangre periférica. En la fase de desarrollo inicial, las células madre hematopoyéticas, encontradas típicamente en la médula ósea, sufren una serie de divisiones celulares para formar células progenitoras pluripotentes que remiten a dos caminos de desarrollo principales: el linaje linfóide y el linaje mielóide. Las células progenitoras asignadas del linaje mielóide se diferencian en 3 sub-ramas principales constituidas por los caminos del desarrollo de eritroides, megacariocitos y granulocitos/monocitos. Un camino adicional conduce a la formación de células dendríticas, que están implicadas en la presentación de antígeno. El linaje eritroide da lugar a glóbulos rojos de la sangre, mientras que el linaje de megacariocitos da lugar a las plaquetas de la sangre. Las células asignadas del linaje granulocitos/monocitos se dividen en caminos de desarrollo de granulocitos o monocitos, conduciendo el primer camino a la formación de neutrófilos, eosinófilos y basófilos, y dando lugar al último camino a monocitos y macrófagos de la sangre.

Las células progenitoras asignadas del linaje linfóide se desarrollan en el camino de las células B, el camino de las células T, o el camino de las células no-T y no-B. Análogamente al linaje mielóide, parece ser que un camino linfóide adicional da lugar a células dendríticas implicadas en la presentación de antígeno. La célula progenitora B se desarrolla en una célula B precursora (pre-B), que se diferencia en células B responsables de la producción de inmunoglobulinas. Las células progenitoras del linaje de las células T se diferencian en células T precursoras (pre-T) que, basándose en la influencia de ciertas citoquinas, se desarrollan en células T citotóxicas o coadyuvantes/supresoras implicadas en la inmunidad mediada por las células. El camino de las células no-T y no-B conduce a la generación de células agresoras naturales (NK). Los neoplasmas de células hematopoyéticas pueden implicar células de cualquier fase de hematopoyesis, con inclusión de células madre hematopoyéticas, células progenitoras pluripotentes, células progenitoras oligopotentes inmunodeficientes, células precursoras, y células maduras diferenciadas. Las categorías de neoplasmas hematopoyéticos pueden seguir generalmente las descripciones y criterios de diagnóstico empleados por los expertos en la técnica (véase, v.g., International Classification of Disease and Related Health Problems (ICD10), Organización Mundial de la Salud (2003)). Los neoplasmas hematopoyéticos pueden caracterizarse también sobre la base de las características moleculares, tales como marcadores de la superficie celular y perfiles de expresión génica, fenotipo celular exhibido por las células aberrantes, y/o aberraciones cromosómicas (v.g., deleciones, translocaciones, inserciones, etc.) características de ciertos neoplasmas hematopoyéticos, tales como el cromosoma Philadelphia encontrado en la leucemia mielógena crónica. Otras clasificaciones incluyen la National Cancer Institute Working Formulation (Cancer, 1982, 49: 2112-2135) y la Revised European-American Lymphoma Classification (REAL).

El "neoplasma linfoide" se refiere a un trastorno proliferativo que implica células del linaje linfoide de la hematopoyesis. Los neoplasmas linfoides pueden surgir de células madre hematopoyéticas así como de células progenitoras linfoides asignadas, células precursoras, y células diferenciadas terminalmente. Estos neoplasmas pueden subdividirse sobre la base de los atributos fenotípicos de las células aberrantes o el estado diferenciado del cual proceden las células anormales. Las subdivisiones incluyen, entre otras, neoplasmas de células B, neoplasmas de células T, neoplasmas de células NK, y linfoma de Hodgkin.

"Neoplasma mieloide" se refiere a un trastorno proliferativo de células del linaje mieloide de la hematopoyesis. Neoplasmas pueden surgir de células madre hematopoyéticas, células progenitoras mieloides asignadas, células precursoras, y células diferenciadas terminalmente. Los neoplasmas mieloides pueden subdividirse basándose en los atributos fenotípicos de las células aberrantes o el estado diferenciado del que proceden las células anormales. Subdivisiones incluyen, entre otras, enfermedades mieloproliferativas, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide aguda, y leucemia bifenotípica aguda.

"Tumor mediado viralmente" se refiere a un neoplasma o tumor asociado con infección viral o una actividad de un producto codificado viralmente. El neoplasma puede deberse a la presencia de un virus latente integrado en el genoma celular o surgir de la actividad de un producto génico asociado viralmente. La infección con el virus no precisa estar fuertemente correlacionada en el tiempo con la formación del tumor, en el sentido de que los periodos de incubación pueden prolongarse desde meses a años antes del desarrollo de un fenotipo tumoral. Debido a que los tratamientos de esta memoria están dirigidos al uso de inhibidores de Syk, los tumores aplicables asociados viralmente son aquellos en los cuales la modulación viral de la actividad de Syk está correlacionada con la proliferación de células aberrantes. Cualquier virus, con inclusión de virus de RNA y DNA y virus que residen episómicamente o se integran en el genoma celular, en los cuales la activación de Syk es una consecuencia de infección viral, puede servir como diana utilizando los métodos de esta memoria.

"Metástasis tumoral" se refiere a la capacidad de las células tumorales para migrar desde el sitio del tumor original y colonizar en otros tejidos. Los tumores formados a partir de células que se han propagado se designan como "tumores secundarios", y contienen células que son similares a las del tumor "primario" original. Los tumores metastásicos se forman típicamente por migración de células tumorales desde el sitio del tumor original a través del sistema sanguíneo y linfático a otros tejidos.

"Señalización de integrinas mediada por Syk" se refiere a la transducción de señales de integrinas de la superficie celular que tienen lugar por interacción con la quinasa Syk. Las integrinas comprenden una familia extensa de receptores de adhesión de la superficie celular que se fijan a la matriz extracelular y los ligandos de la superficie celular. Estructuralmente, las integrinas son proteínas heterodímeras compuestas de una cadena α y β , donde cada subunidad tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal simple, y un dominio citoplásmico. La subunidad α está compuesta generalmente por aproximadamente siete repeticiones en tándem, donde un subconjunto de las repeticiones contiene secuencias supuestas de fijación de metales de la estructura general $DxDxDGxxD$, donde x es cualquier aminoácido. Pueden caracterizarse dos grupos de integrinas por sus subunidades α : aquellas que contienen un dominio "A" y aquellas que contienen un dominio de escisión proteolítico. La subunidad β comprende una región conservada de aproximadamente 200 aminoácidos en el dominio extracelular, que se caracteriza por una región que tiene semejanza estructural con el dominio "A" de la subunidad α , y otra región con repeticiones afines al factor de crecimiento epidérmico (EGF), similares a las encontradas en la laminina (véase, v.g., Xiang et al., 2003, Blood 102 (4): 1156-1159). La actividad de las integrinas puede modular la Syk intracelular, o inversamente, la función de las integrinas puede ser modulada por la actividad de Syk. Generalmente se cree que en algunos casos, las integrinas requieren activación dentro de la célula para fijarse a sus ligandos cognados (activación dentro-fuera). Integrinas que modulan o son moduladas por Syk inducen, entre otras, integrinas $\beta 1$ (Lin et al., J. Biol. Chem. 1995; 270 (27): 16189-97) tales como $\alpha 2\beta 1$ (Keely et al., 1996, J Biol Chem. 271(43):26668-76), integrinas $\beta 2$, e integrinas $\beta 3$ (Woodside et al., 2001, Curr Biol. 11(22):1799-804) tales como $\alpha 11\beta 3$ (Clark et al., J. Biol. Chem. 1994, 269(46):28859-64). Por ejemplo, se cree que Syk se fija directamente a la cola citoplásmica de la integrina $\beta 3$ a través de los dominios SH₂. Sin embargo, al contrario que la fijación de Syk a ITAMs, la interacción con la integrina $\beta 3$ parece ser independiente de la función de fijación de fosfotirosina de los dominios de tándem SH₂.

Generalmente, los trastornos celulares proliferativos que pueden tratarse con los compuestos descritos en esta memoria se refieren a cualquier trastorno caracterizado por proliferación celular aberrante. Éstos incluyen diversos tumores y cánceres, benignos o malignos, metastásicos o no metastásicos. Propiedades específicas de cánceres, tales como invasividad de tejidos o metástasis, pueden servir como diana utilizando los métodos descritos en esta memoria. Trastornos celulares proliferativos incluyen una diversidad de cánceres, con inclusión, entre otras, de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, carcinoma escamoso de pulmón, y adenocarcinoma.

En algunas realizaciones, el trastorno celular proliferativo tratado es un neoplasma hematopoyético, es decir un crecimiento aberrante de células del sistema hematopoyético. Las enfermedades hematopoyéticas malignas pueden tener sus orígenes en células madre pluripotentes, células progenitoras pluripotentes, células progenitoras oligopotentes asignadas, células precursoras, y células diferenciadas terminalmente, implicadas en la hematopoyesis. Algu-

nas enfermedades malignas hematológicas se cree que se derivan de células madre hematopoyéticas, las cuales tienen la capacidad de autorrenovación. Por ejemplo, las células capaces de desarrollar subtipos específicos de leucemia mieloide aguda (AML) después de trasplante, presentan marcadores de la superficie celular de células madre hematopoyéticas, que implican las células madre hematopoyéticas como la fuente de células leucémicas. Los blastocitos que no tienen un marcador celular característico de células madre hematopoyéticas parecen ser incapaces de establecer tumores por trasplante (Blair et al., 1997, Blood 89: 3104-3112). El origen de las células madre de ciertas enfermedades malignas hematológicas encuentra también respaldo en la observación de que anomalías cromosómicas específicas asociadas con tipos particulares de leucemia pueden encontrarse en células normales del linaje hematopoyético así como en células madre leucémicas. Por ejemplo, la translocación recíproca t(9q34;22q11) asociada con aproximadamente el 95% de la leucemia mielógena crónica parece estar presente en células de linaje mieloide, eritroide, y linfoide, lo que sugiere que la aberración cromosómica se origina en las células madre hematopoyéticas. Un subgrupo de células en ciertos tipos de CML exhibe el fenotipo del marcador celular de las células madre hematopoyéticas.

Aunque los neoplasmas hematopoyéticos se originan a menudo de células madre, células progenitoras asignadas o células más diferenciadas terminalmente de un linaje experimental pueden ser también la fuente de algunas leucemias. Por ejemplo, la expresión forzada de la proteína de fusión Bcr/Abl (asociada con leucemia mielógena crónica) en las células progenitoras mieloides comunes o células progenitoras granulocitos/macrófagos produce una condición semejante a la leucemia. Además, algunas aberraciones cromosómicas asociadas con subtipos de leucemia no se encuentran en la población de células con un fenotipo marcador de las células del tallo hematopoyético, pero se encuentran en una población de células que exhiben marcadores de un estado más diferenciado del camino hematopoyético (Turhan et al., 1995, Blood 85: 2154-2161). Así, si bien las células progenitoras asignadas y otras células diferenciadas pueden tener solamente un potencial limitado para la división celular, las células leucémicas pueden haber adquirido la capacidad para crecer de modo incontrolado, mimetizando en algunos casos las características de auto-renovación de las células madre hematopoyéticas (Passegue et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 11842-9).

En algunas realizaciones, el neoplasma hematopoyético tratado es un neoplasma linfoide, donde las células anormales se derivan de y/o exhiben el fenotipo característico de las células del linaje linfoide. Los neoplasmas linfoides pueden subdividirse en neoplasmas de células B, neoplasmas de células T y NK, y linfoma de Hodgkin. Los neoplasmas de células B pueden subdividirse ulteriormente en neoplasma de células B precursoras y neoplasma de células B maduras/periféricas. Neoplasmas ilustrativos de células B son leucemia/linfoma linfoblástico B precursor (leucemia linfoblástica aguda de células B precursora), mientras que neoplasmas ilustrativos maduros/periféricos de células B son leucemia linfocítica crónica de las células B, linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de las células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma marginal esplénico de la zona de las células B, leucemia de células pilosas, mieloma/plasmacitoma de células plasmáticas, linfoma extranodal de las células B de la zona marginal de tipo MALT, linfoma de la zona marginal nodal de las células B, linfoma folicular, linfoma de las células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de las células B grandes del mediastino, linfoma de efusión primario, y linfoma de Burkitt/leucemia de las células Burkitt. Los neoplasmas de las células T y células NK se subdividen ulteriormente en neoplasmas de células T precursoras y neoplasmas de las células T maduras (periféricas). Un neoplasma ilustrativo de las células T precursoras es el linfoma/leucemia T-linfoblástico precursor (leucemia linfoblástica precursora aguda de las células T) mientras que neoplasmas ilustrativos de las células T maduras (periféricas) son la leucemia prolinfocítica de las células T, la leucemia prolinfocítica granular de las células T, la leucemia de las células NK agresivas, el linfoma/leucemia de las células T adultas (HTLV-1), el linfoma de las células NK/T extranodal, de tipo nasal, linfoma de las células T de tipo enteropático, el linfoma hepatoesplénico de las células T gamma-delta, el linfoma de las células T afín a la paniculitis subcutánea, el síndrome Micosis fungoides/Sezary, el linfoma anaplásico de células grandes, el tipo cutáneo primario de células T/nulas, el linfoma periférico de las células T no caracterizado de otro modo, el linfoma de células T angioinmunoblástico, el linfoma anaplásico de células grandes, de células T nulas, de tipo sistémico primario. El tercer miembro de neoplasmas linfoides es el linfoma de Hodgkin, al que se hace referencia también como enfermedad de Hodgkin. Diagnoses ilustrativas de esta clase que pueden tratarse con los compuestos incluyen, entre otros, el linfoma de Hodgkin nodular con predominio de linfocitos, y diversas formas clásicas de enfermedad de Hodgkin, miembros ilustrativos de las cuales son el linfoma de Hodgkin de la esclerosis nodular (grados 1 y 2), el linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos (linfoma de Hodgkin de celularidad mixta, y el linfoma de Hodgkin de agotamiento de los linfocitos. En diversas realizaciones, cualquiera de los neoplasmas linfoides que están asociados con la actividad aberrante de Syk puede tratarse con los compuestos inhibidores de Syk.

En algunas realizaciones, el neoplasma hematopoyético tratado es un neoplasma mieloide. Este grupo comprende una clase extensa de trastornos celulares proliferativos que implican o exhiben el fenotipo característico de las células del linaje mieloide. Los neoplasmas mieloides pueden subdividirse en enfermedades mieloproliferativas, enfermedades mielodisplásticas/mieloproliferativas, síndromes mielodisplásticos, y leucemias mieloides agudas. Enfermedades mieloproliferativas ilustrativas son leucemia mielógena crónica (v.g., cromosoma Philadelphia positivo (t(9;22)(qq34;q11)), leucemia neutrofílica crónica, síndrome leucemia eosinofílica/hipereosinofílica crónica, mielofibrosis idiopática crónica, policitemia vera, y trombocitemia esencial. Enfermedades mielodisplásticas/mieloproliferativas ilustrativas son leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielógena crónica atípica, y

leucemia mielomonocítica juvenil. Síndromes mielodisplásicos ilustrativos son anemia refractaria, con sideroblastos en anillo y sin sideroblastos en anillo, citopenia refractaria (síndrome mielodisplásico) con displasia multilineal, anemia refractaria (síndrome mielodisplásico) con exceso de blastos, síndrome 5q, y síndrome mielodisplásico con t(9;12)(q22;p12) (fusión TEL-Syk; véase, v.g., Kuno et al., 2001, *Blood* 97: 1050). En diversas realizaciones, cualquiera de los neoplasmas mieloides que están asociados con la actividad aberrante de Syk puede tratarse con los compuestos inhibidores de Syk.

En algunas realizaciones, los compuestos inhibidores de Syk pueden ser para uso en un método para tratar leucemias mieloides agudas (AML), que representan una amplia clase de neoplasmas mieloides que tienen su propia subdivisión de trastornos. Estas subdivisiones incluyen, entre otras, AMLs con translocaciones citogenéticas recurrentes, AMLs con displasia multilineal, y otras AML no clasificadas de otro modo. AMLs ilustrativas con translocaciones citogenéticas recurrentes incluyen, entre otras, AML con t(8;21)(q22;q22), AML1 (CBF-alfa)/ETO, leucemia promielocítica aguda (AML con t(15;17)(q22;q11-12) y variantes, PML/RAR-alfa), AML con eosinófilos anormales en la médula ósea (inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q11), CBFb/MYH11X, y AML con anomalías 11q23 (MLL). AML ilustrativas con displasia multilineal son aquellas que están asociadas con o sin síndrome mielodisplásico previo. Otras leucemias mieloides agudas no clasificadas dentro de cualquier grupo definible incluyen, AML mínimamente diferenciada, AML sin maduración, AML con maduración, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia megacariocítica aguda, leucemia basofílica aguda, y panmielosis aguda con mielofibrosis.

En otros aspectos, trastornos celulares proliferativos que pueden servir como diana con los inhibidores de la quinasa Syk comprenden tumores mediados por virus. Éstos pueden surgir de infección de células por un virus oncogénico que tiene la capacidad de transformar una célula normal en una célula tumoral. Dado que las tasas de infección viral exceden con mucho del número de incidencia real de transformación celular, la transformación mediada por virus actúa generalmente junto con otros factores celulares para generar una célula tumoral transformada. Así, un tumor mediado por virus no requiere que el virus sea el único agente causal del trastorno celular proliferativo, sino que más bien la infección viral o la presencia persistente de virus está asociada con la generación del tumor. Por regla general, los tumores en los cuales el agente causante es un virus tienen típicamente una expresión continuada de un número limitado de genes virales y que estos oncogenes virales expresados como parte de la infección viral o por persistencia del virus, alteran la expresión normal de los genes celulares y los caminos de transducción de señales. Sin quedar ligados a la teoría, los oncogenes virales implicados en la transformación celular parecen alterar cuatro procesos celulares principales: receptores de la superficie celular que interactúan con factores de crecimiento y matriz extracelular, redes de señalización transmembranal, elementos citosólicos tales como proteínas solubles y segundos mensajeros, y proteínas nucleares que incluyen proteínas de fijación de DNA y factores que funcionan directa e indirectamente en la regulación y replicación de genes. Dado que ciertas proteínas codificadas por virus están dirigidas a componentes celulares específicos como parte del proceso de transformación, la aplicación de inhibidores de Syk puede ser apropiada en los casos en que el componente viral está dirigido a la actividad de la quinasa Syk.

En algunas realizaciones, el tumor mediado viralmente que puede tratarse con los compuestos descritos en esta memoria está asociado con cualquier virus que codifique un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) capaz de modular la actividad de Syk. Este motivo, como se ha indicado arriba, hace referencia a un motivo de secuencia de aminoácidos conservado que funciona por interacción con y activación de tirosina-quinasas no receptoras. Motivos ITAM se encuentran en, entre otros, luego y las cadenas γ y ϵ del receptor de las células T, e inmunoglobulina β (Ig β) e Ig α del receptor de las células B. El motivo de la secuencia canónica es típicamente Yxx(L/I)_x₆₋₈ Ixx(L/I), donde x representa cualquier aminoácido. Generalmente, los residuos tirosina en el motivo están implicados en la señalización ITAM y son sustratos para fosforilación por la familia de quinasas Src. La forma fosforilada de ITAMs funciona como sitios de interacción para SH2 (dominio de homología src) que contiene proteínas de señalización, tales como las quinasas Syk/ZAP-70. Además de su presencia en una diversidad de moléculas de superficie celular de las células, las secuencias ITAM han sido identificadas en proteínas codificadas viralmente. Teniendo en cuenta las descripciones de esta memoria que indican la fusión de la quinasa Syk como un oncogén, los tumores asociados con virus que transportan genes que codifican proteínas con secuencias ITAM pueden tratarse con compuestos inhibidores de Syk.

De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, el tumor mediado viralmente que puede tratarse con los compuestos inhibidores está asociado con el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KS), un virus linfotrópico implicado en el sarcoma de Kaposi, una enfermedad maligna rara encontrada con mayor incidencia entre la población infectada con HIV. El virus del herpes asociado a KS codifica una proteína transmembranal designada KI, que tiene una secuencia afín al motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM). Se cree que el producto del gen KI actúa de una manera constitutiva por su ectodominio rico en cisteína para activar Syk y su quinasa afín Zap-70 (Lagunoff, M., et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (10): 5704-5709). En respaldo adicional de los métodos de esta memoria, los ratones transgénicos que llevan el gen KI parecen aumentar la incidencia de ciertos sarcomas y linfomas en un animal infectado, indicando un papel para la actividad de KI en la oncogénesis (Prakash et al., 2002, *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 926-35).

En algunas realizaciones, el tumor mediado viralmente está asociado con el Virus Epstein-Barr (EBV). El Virus Epstein-Barr es un miembro de la familia Herpesviridae que, después de la infección primaria, se replica en las células epiteliales de la orofaringe e infecta los linfocitos B recirculantes. La infección puede conducir a mononucleosis infecciosa aguda, conocida también como fiebre glandular. La mononucleosis infecciosa es una enfermedad linfoproliferativa benigna caracterizada por inmunosupresión transitoria y una expansión de linfocitos atípicos, la mayoría de los cuales son células T CD8⁺. En estas células T, el EBV establece una infección latente pero persistente durante la cual se expresan una serie seleccionada de genes virales. El genoma entero puede persistir en los linfocitos proliferantes como DNA episómico. La infección por EBV está asociada con el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin, y el linfoma de las células T adultas.

La proteína LMP2A codificada por el genoma de EBV es una proteína transmembranal que se cree juega un papel en el mantenimiento de la latencia del virus EBV después de la infección. La misma consiste en una cola aminoterminal extendida, 12 dominios que abarcan la membrana, y un dominio citoplásmico. La región aminoterminal contiene el motivo ITAM, que permite la interacción de LMP2A con la quinasa Syk (Fruehling et al., 1997, *Virology*, 235: 241-251). Parece ser que LMP2A regula la quinasa Syk en las células linfoides para promover la supervivencia de las células B y mantener la latencia. Dado que Syk juega un papel crítico en los caminos de transducción de señales que regulan otros caminos de señalización, tales como PI-3K, BLNK, y la fosfolipasa $\alpha 2$ y está implicado en la mejora de la supervivencia de las células linfoides, la activación impropia de Syk por la proteína LMP2A u otros efectores mediados por virus puede jugar un papel en la inducción de la linfoproliferación aberrante (Caldwell et al., 2000, *J. Virol.* 74 (19): 9115; Caldwell et al., 1998, *Immunity* 9: 405)). Así pues, la inhibición de la actividad de Syk puede proporcionar un beneficio terapéutico para trastornos celulares proliferativos asociados con la infección viral de EBV.

En algunas realizaciones, el tumor mediado viralmente a tratar con el inhibidor de Syk está asociado con el Virus Linfotrópico de las células T humanas (Virus HTLV-1), un retrovirus de la misma clase del virus que el virus del SIDA, HIV-1. El virus es trópico para las células T CD4⁺, aunque las células T CD8⁺ pueden servir también como reserva viral. La infección por HTLV-1 está asociada con, entre otras, la leucemia/linfoma de las células T adultas (ATLL) y cierto número de otros trastornos linfocíticos. Durante la infección por HTLV-1, Syk se expresa en las células infectadas, si bien la expresión de la quinasa afín a Syk, ZAP-70, está ausente (Weil et al., 1999, *J. Virol.* 73 (5): 3709-17). La disregulación de cierto número de quinasas, con inclusión de Syk, está implicada en la inducción mediada por HTLV-1 de la leucemia de las células T adultas.

En algunas realizaciones, el tumor mediado viralmente está asociado con el virus del tumor mamario (MTV). Se encuentran secuencias ITAM dentro del gen Env del virus del tumor mamario murino MMTV, un retrovirus de tipo B identificado como un agente etiológico para el cáncer de mama en los ratones. Las células epiteliales mamarias de ratón transfectadas con el gen Env de MMTV exhiben características de un fenotipo transformador, tales como formación de colonias en agar blando e invasividad en preparaciones de membrana basal (Katz et al., 2005, *J. Exp. Med.* 201 (3): 401-9). Secuencias semejantes al virus del tumor mamario murino están presentes también en los cánceres humanos, tales como el cáncer de mama y los linfomas de las células T (Wang et al., 2000, *Clinical Cancer Res.* 6: 1273-1278), y correlacionadas con la tumorigénesis, dado que estas secuencias no se observan en la mayor parte de los tejidos mamarios normales. Así pues, los tumores asociados con MTV pueden tratarse con los inhibidores de la quinasa Syk.

Debe entenderse que el uso de compuestos inhibidores de Syk para el tratamiento de tumores mediados por virus no está limitado a tumores asociados con el virus arriba especificado. Como se ha indicado, cualquiera tumores asociados con un virus oncogénico en el cual está activada Syk como parte de su mecanismo oncogénico, tanto si el mismo implica secuencias ITAM como si no lo hace, pueden servir como diana utilizando los compuestos inhibidores de Syk.

En algunas realizaciones, el trastorno celular proliferativo que puede servir como diana con los inhibidores comprenden trastornos celulares proliferativos asociados con actividad aberrante de la quinasa Flt-3. El término "actividad aberrante de la quinasa Flt-3" hace referencia a una actividad que es anormal con respecto a lo que podría ser el nivel normal de actividad de la quinasa Flt-3 para una quinasa Flt-3 de tipo salvaje o en una célula, tejido, órgano u organismo normal que expresara Flt-3. La actividad aberrante de la quinasa Flt-3 puede originarse por la localización errónea de la proteína (expresión espacial), aumentos o disminución en la actividad de la enzima (directa o indirectamente), o cambios en la expresión temporal (es decir, expresión del desarrollo).

En algunas realizaciones, la actividad aberrante de la quinasa está asociada con variantes de Flt-3. En algunas realizaciones, estas variantes se caracterizan por actividad incrementada de la quinasa receptora Flt-3. Como se utiliza en esta memoria, "actividad incrementada de quinasa" hace referencia a actividad de quinasa que es mayor que la observada para una quinasa Flt-3 de tipo salvaje o en una célula, tejido, órgano u organismo normal que exprese Flt-3. Se encuentra actividad ilustrativa incrementada de quinasa en células con ciertas variantes de Flt-3, tales como por ejemplo, mutaciones del bucle de activación de Flt-3 ITD y Flt-3.

Dado que la actividad aberrante de la quinasa Flt-3 se observa en muchos tipos diferentes de neoplasmas hematológicos, en algunas realizaciones, los compuestos inhibidores de Syk/Flt-3 pueden estar destinados a utilización en

un método de tratamiento de neoplasmas hematopoyéticos caracterizados por la presencia de una quinasa Flt-3 aberrante. Así, en algunas realizaciones, los neoplasmas hematológicos que pueden tratarse con el compuesto inhibidor de Syk/Flt-3 pueden incluir, entre otros, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de las células B precursoras, leucemia linfoblástica aguda de las células T, y leucemia mielógena crónica (CML) en los cuales ha sido diagnosticada o se sospecha en el individuo la presencia de una Flt-3 aberrante. Sin embargo, debe entenderse que el experto puede aplicar los tratamientos sin dicha información y que los compuestos inhibidores pueden administrarse profilácticamente para aumentar la probabilidad de supervivencia. Además, el experto puede aplicar los compuestos inhibidores de Syk/Flt-3 de esta memoria a otros trastornos celulares proliferativos en los cuales se haya detectado o se sospeche una actividad aberrante de la quinasa Flt-3.

En otros aspectos, la presente descripción está dirigida al tratamiento de metástasis tumorales por el uso de los inhibidores de la quinasa Syk. La metástasis es una característica de las células tumorales malignas por la cual las células tumorales se desprenden de su sitio de origen y se propagan luego para colonizar en otros sitios. Estos tumores secundarios pueden formarse en tejidos no relacionados con las células de las que proceden las células tumorales. Es la formación de estos tumores secundarios por metástasis lo que parece ser la causa primaria de mortalidad de las formas malignas del cáncer. La metástasis comienza cuando las células malignas se desprenden del tumor primario y entran en el sistema sanguíneo o linfático, y migran luego a otros sitios de colonización. Generalmente, las células normales no se desprenden e invaden estos tejidos debido a diversas señales que inhiben que células distintas se adhieran unas a otras, así como señales entre las células que inhiben el crecimiento celular. La transformación de las células, sin embargo, altera estos programas de regulación normales de tal modo que las células tumorales interaccionan con las células tisulares locales para modificar la matriz extracelular local, estimular la migración, y promover la proliferación y supervivencia. Las alteraciones de las moléculas de adhesión celular (CAMs), tales como los miembros de las familias de inmunoglobulinas y las cadherinas dependientes de calcio y las integrinas, parecen jugar un papel crítico en la invasión y metástasis. Por ejemplo, la alteración de N-CAM de una isoforma fuertemente adhesiva a una forma débilmente adhesiva, que junto con su regulación decreciente, puede conducir a un cáncer de páncreas invasivo.

Otra clase de proteínas de adhesión implicadas en la invasividad y metástasis tisular son las integrinas. Como se ha indicado arriba, las integrinas forman una clase diversa de moléculas de la superficie celular. Permutaciones en el espectro de los más de 22 subtipos de integrina son capaces de crear un sistema flexible para una interacción cambiante de las células en respuesta a diferentes estados de señalización celular o ambientes externos cambiantes. Las integrinas interaccionan dinámicamente con ligandos extracelulares dependientes del estado de activación de la integrina, que está controlado por señales intracelulares (es decir, señalización de dentro a fuera) que modifica la afinidad y avidéz de las integrinas. Inversamente, la interacción de una integrina con ligandos extracelulares puede desencadenar cascadas de transducción de señales que afectan a las propiedades adhesivas de la célula y respuestas celulares a ambientes extracelulares cambiantes (es decir, señalización de fuera a dentro). Los cambios en la expresión de las subunidades de integrina inducen o inhiben el crecimiento invasivo y metastásico, implicando estas proteínas como determinante crítico de estos procesos (Guo et al., 2004, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5(10): 816-26; Jin et al., 2004, Br. J. Cancer, 90: 561-565). Por ejemplo, la integrina $\alpha v \beta 3$ es necesaria para la angiogénesis, y su regulación creciente está correlacionada con la invasividad y el potencial metastásico de los tumores (Liapis et al., 1996, Diag. Mol. Pathol. 23: 127-135). Las células de cáncer de mama metastásico cultivadas exhiben expresión constitutiva de $\alpha v \beta 3$ (Pecheur et al., 2002, FASEB J. 16: 1966-1968) mientras que la inhibición de la actividad de la integrina que contiene la subunidad α_v , por ejemplo por el uso de agentes peptidomiméticos RGD que compiten respecto a la fijación de la integrina con su sustrato natural, puede reducir el potencial metastásico de los tumores sin afectar a las propiedades de proliferación celular (Kristen et al., 2004, Clin. Exp. Metastasis 21 (2):129-38; Harms et al., 2004, Clin. Exp. Metastasis 21 (2):119-28). Análogamente, la sobre expresión de las integrinas $\beta 1$ puede alterar las uniones adherentes que funcionan para mantener las células unidas a la membrana basal.

La actividad de la quinasa Syk está asociada con diversas integrinas expresadas en las células del linaje hematopoyético, pero también en células no hematopoyéticas. La quinasa Syk está implicada en la señalización de la integrina $\beta 1$ de las células epiteliales del pulmón (Ulanova et al., 2004, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 288:L497-L507) y los monocitos (Lin et al., 1995, J. Biol. Chem. 270 (27):16189-97). La señalización de la integrina $\beta 2$ en granulocitos/neutrófilos (Miura et al., 2000, Blood 96 (5):1733-9; Kusumoto et al., 2001, Microbiol. Immunol. 45(3): 241-8), y la señalización de la integrina $\beta 3$ en la activación de las plaquetas y la adhesión celular (Gao et al., 1997, EMBO J. 16 (21):6414-25). Dada la conexión proporcionada en esta memoria entre la actividad de la quinasa Syk y la tumorigénesis, el uso de inhibidores de la quinasa Syk en la atenuación de la invasividad y las propiedades metastásicas de los tumores se indica por el enlace entre la actividad de la quinasa Syk y ciertas integrinas (Mocsai et al., 2002, Immunity 16(4):547-58). Así, en algunas realizaciones, los inhibidores de la quinasa Syk pueden ser útiles en un método para modulación de las propiedades metastásicas de los tumores mediadas por actividad de integrina. En algunas realizaciones, los inhibidores de la quinasa Syk pueden ser útiles en un método para atenuación de la invasividad de los tejidos por las células tumorales y el potencial metastásico afectado por las integrinas $\beta 1$ (Lin et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:16189-16197; Kusumoto et al., Microbiol. Immunol., 2001, 45 (3):241-8; Ortiz-Stern et al., 2005, J. Leukoc. Biol. (Epub)). Una integrina ilustrativa de este tipo es la integrina $\alpha_2 \beta_1$.

En algunas realizaciones, los inhibidores de la quinasa Syk pueden utilizarse en un método para atenuación de la invasividad de los tejidos por células tumorales y el potencial metastásico afectado por la actividad de integrinas $\beta 2$ (CD18) (Willeke et al., 2003, J. Leukoc. Biol. 74 (2):260-9). Éstas incluyen, entre otras, CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18 y CD11d/CD18. En realizaciones adicionales, los inhibidores de la quinasa Syk pueden estar destinados a ser utilizados en un método para atenuación de la invasividad de los tejidos por células tumorales y el potencial metastásico afectado por la actividad de las integrinas $\beta 3$. Integrinas ilustrativas de este tipo son $\alpha_{IIb}\beta_3$ y $\alpha v\beta_3$.

Diversos tipos de tumor susceptibles de metástasis pueden tratarse con los compuestos inhibidores de Syk. Dichos tumores incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, carcinoma escamoso de pulmón, y adenocarcinoma (véase, v.g., Felding-Habermann et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (4):1853-8). El tratamiento terapéutico para atenuar la metástasis de tumores establecidos puede seguir a una diagnosis de metástasis. Si no se ha hecho diagnosis de metástasis alguna, el compuesto inhibidor puede administrarse profilácticamente para reducir la probabilidad de metástasis.

Debe entenderse que los compuestos inhibidores de Syk se pueden utilizar independientemente de cualquier otro tratamiento, o utilizarse en combinación con otros regímenes de tratamiento del cáncer, que incluyen cirugía, radiología, u otras quimioterapias. De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, los inhibidores de la quinasa Syk pueden estar destinados a ser utilizados en un método en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Los tratamientos de combinación con los inhibidores de Syk pueden dirigirse a componentes celulares diferentes por elección apropiada del segundo agente quimioterapéutico. Por ejemplo, los inhibidores de Syk pueden estar destinados en algunas realizaciones a ser utilizados en un método para limitar el potencial metastásico de las células tumorales, mientras que otro agente quimioterapéutico puede estar dirigido a ser utilizado para eliminar o destruir las células aberrantes.

Diversos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse en combinación con los inhibidores de la quinasa Syk para tratar trastornos celulares proliferativos. Estos agentes quimioterapéuticos pueden ser agentes citotóxicos generales o estar dirigidos a una molécula celular específica. Diversas clases de agentes quimioterapéuticos del cáncer incluyen, entre otras, antimetabolitos, agentes que reaccionan con el DNA (v.g., agentes alquilantes, compuestos de coordinación, etc.), inhibidores de enzimas de transcripción, inhibidores de topoisomerasas, compuestos que se fijan a la hendidura menor del DNA, agentes antimitóticos (v.g., alcaloides de la vinca), antibióticos antitumorales, hormonas, y enzimas. Agentes alquilantes ilustrativos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, meclorotamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucil, etileniminas, metilmelaminas, alquil-sulfonatos (v.g., busulfán), y carmustina. Antimetabolitos ilustrativos incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, el análogo de ácido fólico metotrexato; los análogos de pirimidina fluorouracilo y citosina-arabinosido; y los análogos de purina mercaptopurina, tioguanina, y azatioprina. Alcaloides de la vinca ilustrativos incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, vinblastina, vincristina, paclitaxel, y colchicina. Antibióticos antitumorales ilustrativos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, actinomicina D, daunorrubicina, y bleomicina. Una enzima ilustrativa eficaz como agente antineoplásico es L-asparaginasa. Compuestos de coordinación ilustrativos incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, cisplatino y carboplatino. Hormonas y compuestos afines a hormonas ilustrativos incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, los adrenocorticosteroides prednisona y dexametasona; los inhibidores de las aromatasas amino-glutetimida, formestano, y anastrozol; los compuestos de progestina caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona; y el compuesto antiestrogénico tamoxifeno. Inhibidores ilustrativos de las topoisomerasas incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, amsacrina (m-AMSA); mitoxantrona, topotecán, irinotecán y camptotecina.

Estos y otros compuestos anti-cáncer útiles se describen en el Merck Index, edición 13^a (O'Neil, M.J. et al., ed) Merck Publishing Group (2001) y Goodman y Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a edición, Hardman, J.G. y Limbird, L.E. eds., pag. 1381-1287, McGraw Hill, (1996).

Otros compuestos anti-proliferativos útiles en combinación con los compuestos inhibidores de Syk incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, anticuerpos dirigidos contra receptores de factores de crecimiento (v.g., anti-Her2); citoquinas tales como interferón- α e interferón- γ , interleuquina-2 y GM-CSF; y análogos para marcadores de la superficie celular (v.g., anti-CTLA-4, anti-CD20 (rituximab); anti-CD33). Cuando se utilizan anticuerpos contra marcadores de la superficie celular, un agente quimioterapéutico puede conjugarse al mismo para direccionamiento específico a la célula tumoral. Conjugados adecuados incluyen compuestos radioactivos (v.g., un metal radiactivo unido a un formador de quelatos conjugado con anticuerpo), compuestos citotóxicos, y enzimas activadoras de fármacos (v.g., alinasa, peptidasas, esterases, anticuerpos catalíticos, etc.) (véase, v.g. Arditti et al., 2005, Mol. Cancer Therap. 4 (2):325-331; patente U.S. No. 6.258.360.

En algunas realizaciones, los inhibidores de Syk pueden estar destinados a utilización en un método con un segundo inhibidor de quinasas que está dirigido a una quinasa oncogénica diferente de Syk o Syk y Flt-3. Dado que los inhibidores de Syk se describen en esta memoria para el tratamiento de neoplasmas hematopoyéticos, pueden utilizarse también otros inhibidores de quinasas compatibles utilizados para tratamiento de neoplasmas hematopoyéticos. En algunas realizaciones, el segundo inhibidor de quinasas es un inhibidor de la quinasa Abl. La

leucemia mielógena crónica es un neoplasma mielóide caracterizado por proliferación maligna de células madre leucémicas en la médula ósea. La mayoría de las leucemias mielógenas crónicas están asociadas con una anomalía citogenética definida por una translocación recíproca t (9; 22) (q34; q11). Esta aberración cromosómica da como resultado la generación de una proteína de fusión BCR/ABL con actividad de quinasa activada. Los inhibidores de la actividad de quinasa de la proteína de fusión pueden ser eficaces en el tratamiento de la leucemia mielógena crónica, aunque pueden desarrollarse formas resistentes después de tratamiento continuado. El uso de inhibidores de la quinasa Syk en combinación con inhibidores de la quinasa Abl puede reducir las probabilidades de células resistentes por direccionamiento de un proceso celular distinto del direccionado por el segundo inhibidor de quinasa. Un inhibidor ilustrativo de la quinasa Abl es 2-fenilaminopirimidina, conocido también como imatinib-mesilato y Gleevec®. Así, en algunas realizaciones, los inhibidores de la quinasa Syk pueden utilizarse en un método en combinación con el inhibidor de la quinasa Abl 2-fenilaminopirimidina y sus derivados. En otras realizaciones, el segundo inhibidor de quinasa puede ser pirido[2,3-d]pirimidina y sus derivados, que fueron identificados originalmente como inhibidores de la quinasa Src. En otras realizaciones adicionales, el segundo inhibidor de quinasa puede ser tirfostina y sus derivados (v.g., adafostina), que pueden afectar a la asociación de la quinasa con sus sustratos. Otros compuestos inhibidores de quinasas serán evidentes para el experto.

Como se describe más adelante en esta memoria, la administración de otros agentes quimioterapéuticos puede hacerse en la forma de una composición, o administrarse juntamente en combinación con el inhibidor de Syk. Cuando se proporcionan juntos, los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse simultánea o consecutivamente a la administración del inhibidor de Syk.

6.2 Inhibidores de la quinasa Syk y de las quinasas Syk/Flt-3

Con referencia a diversos inhibidores, los términos utilizados para describir los compuestos tendrán su significado ordinario y común como es utilizado por los expertos a no ser que se proporcione en esta memoria una definición diferente o se proporcione en las referencias que describen los compuestos inhibidores específicos.

"Alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarbonado monovalente saturado o insaturado, ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene el número indicado de átomos de carbono (a saber, C₁-C₆ significa de 1 a 6 átomos de carbono) obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono simple o un alcano, alqueno o alquino originario. Grupos alquilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, metilo; etilos tales como etanol, etenilo, etinilo; propilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo, ciclopropan-1-ilo, prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo (alilo), cicloprop-1-en-1-ilo, cicloprop-2-en-1-ilo, prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo, 2-metil-propan-1-ilo, 2-metil-propan-2-ilo, ciclobutan-1-ilo, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-3-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, but-1-in-1-ilo, but-3-in-1-ilo etc.; y análogos. El término "alquilo" tiene específicamente por objeto incluir grupos que tienen cualquier grado o nivel de saturación, es decir, grupos que tienen exclusivamente enlaces carbono-carbono simples, grupos que tienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, grupos que tienen uno o más enlaces triples carbono-carbono y grupos que tienen mezclas de enlaces carbono-carbono simples, dobles y triples. En los casos en que se quiere dar a entender un nivel específico de saturación, se utilizan las expresiones "alcanilo", "alquenilo", y "alquinilo". La expresión "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo compuestos de 1 a 6 átomos de carbono.

"Alcanilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquilo saturado, ramificado, de cadena lineal o cíclico. Grupos alcanilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, metanilo; etanilo; propanilos tales como propan-1-ilo, propan-2-ilo (isopropilo), ciclopropan-1-ilo, etc.; butanilos tales como butan-1-ilo, butan-2-ilo (sec-butilo), 3-metil-propan-1-ilo (isobutilo), 2-metil-propan-2-ilo (terc-butilo), ciclobutan-1-ilo, etc.

"Alquenilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo alquilo insaturado ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene al menos un enlace doble carbono-carbono producido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alqueno originario. El grupo puede encontrarse en la conformación cis o trans alrededor del o de los enlaces dobles. Grupos alquenilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, etenilo; propenilos tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo (alilo), prop-2-en-2-ilo, cicloprop-1-en-1-ilo; cicloprop-2-en-1-ilo; butenilos tales como but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo, ciclobut-1-en-1-ilo, ciclobut-1-en-3-ilo, ciclobuta-1,3-dien-1-ilo, etc.

"Alquinilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo alquilo insaturado ramificado, de cadena lineal o cíclico que tiene al menos un enlace triple carbono-carbono producido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un alquino originario. Grupos alquinilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, etinilo; propinilos tales como prop-1-in-1-ilo, prop-2-in-1-ilo, etc.; butinilos tales como but-1-in-1-ilo, but-1-in-3-ilo, but-3-in-1-ilo, etc.

"Sistema de Anillos Aromáticos Originario" hace referencia a un sistema de anillos insaturado, cíclico o policíclico que tiene un sistema de electrones pi conjugados. Incluidos específicamente dentro de la definición de "sistema de

anillos aromáticos originario" se encuentran sistemas de anillos condensados en los cuales uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos son saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, fluoreno, indano, indeno, fenaleno, etc. Sistemas de anillos aromáticos originarios típicos incluyen, pero sin carácter limitante, aceantrileno, acenaftileno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, crisenno, cromeno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno, y análogos.

"Arilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarbonado aromático monovalente que tiene el número indicado de átomos de carbono en los anillos (a saber, C₅-C₁₄ significa de 5 a 14 átomos de carbono en los anillos) obtenidos por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillos aromáticos originario. Grupos arilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, grupos derivados de aceantrileno, acenafteno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, benceno, crisenno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, hexaceno, hexafeno, hexaleno, as-indaceno, s-indaceno, indano, indeno, naftaleno, octaceno, octafeno, octaleno, ovaleno, penta-2,4-dieno, pentaceno, pentaleno, pentafeno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadenno, pireno, pirantreno, rubiceno, trifenileno, trinaftaleno, y análogos. En realizaciones preferidas, el grupo arilo es (C₅-C₁₄)arilo, siendo (C₅-C₁₀) aún más preferido. Arilos particularmente preferidos son ciclopentadienilo, fenilo y naftilo.

"Arlalquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquilo acíclico en el cual uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp₃, está reemplazado con un grupo arilo. Grupos arilalquilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y análogos. En los casos en que se quieren dar a entender restos alquilo específicos, se utiliza la nomenclatura arilalcanilo, arilalquenilo y/o arilalquinilo. En realizaciones preferidas, el grupo arilalquilo es (C₆-C₁₆)arilalquilo, v.g., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C₁-C₆) y el resto arilo es (C₅-C₁₀). En realizaciones particularmente preferidas, el grupo arilalquilo es (C₆-C₁₃), v.g., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del grupo arilalquilo es (C₁-C₃) y el resto arilo es (C₅-C₁₀).

"Sistema de Anillos Heteroaromáticos Originario" hace referencia a un sistema de anillos aromáticos originario en el cual uno o más átomos de carbono están reemplazados independientemente con los mismos o diferentes heteroátomos o grupos heteroatómicos. Heteroátomos o grupos heteroatómicos típicos para reemplazar los átomos de carbono incluyen, pero sin carácter limitante, N, NH, P, O, S, Si, etc. Incluidos específicamente dentro de la definición de "sistemas de anillos heteroaromáticos originarios" se encuentran sistemas de anillos condensados en los cuales uno o más de los anillos son aromáticos y uno o más de los anillos son saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, arsindol, benzodioxano, benzofurano, cromano, cromeno, indol, indolina, xanteno, etc. Se incluyen también en la definición de "sistema de anillos heteroaromáticos originario" aquellos anillos reconocidos que incluyen sustituyentes, tales como benzopirona. Sistemas de anillos heteroaromáticos originarios típicos incluyen, pero sin carácter limitante, arsindol, benzodioxano, benzofurano, benzopirona, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinnolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinoleína, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinoleína, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y análogos.

"Heteroarilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo heteroaromático monovalente que tiene el número indicado de átomos de anillo (a saber, "de 5-14 miembros" significa de 5 a 14 átomos de anillo) producido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de un sistema de anillos heteroaromáticos originario. Grupos heteroarilo típicos incluyen, pero sin carácter limitante, grupos derivados de acridina, arsindol, carbazol, β-carbolina, cromano, cromeno, cinnolina, furano, imidazol, indazol, indol, indolina, indolizina, isobenzofurano, isocromeno, isoindol, isoindolina, isoquinoleína, isotiazol, isoxazol, naftiridina, oxadiazol, oxazol, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirano, pirazina, pirazol, piridazina, piridina, pirimidina, pirrol, pirrolizina, quinazolina, quinoleína, quinolizina, quinoxalina, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofeno, triazol, xanteno, y análogos.

"Heteroarilalquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, hace referencia a un grupo alquilo acíclico en el cual uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, típicamente un átomo de carbono terminal o sp₃, está reemplazado con un grupo heteroarilo. En los casos en que se quieren dar a entender restos alquilo específicos, se utiliza la nomenclatura heteroarilalcanilo, heteroarilalquenilo y/o heteroarilalquinilo. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-20 miembros, v.g., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo del heteroarilalquilo tiene 1-6 miembros y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-14 miembros. En realizaciones particularmente preferidas, el heteroarilalquilo es un heteroarilalquilo de 6-13 miembros, v.g., el resto alcanilo, alquenilo o alquinilo tiene 1-3 miembros y el resto heteroarilo es un heteroarilo de 5-10 miembros.

"Alquilo, Arilo, Arilalquilo, Heteroarilo o Heteroarilalquilo Sustituido" se refiere a un grupo alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo o heteroarilalquilo en el cual uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados con otro grupo sustituyente. Grupos sustituyentes ilustrativos incluyen, pero sin carácter limitante, -OR', -SR', -NR'R', -NO₂, -NO, -CN, -

CF₃, halógeno (v.g., -F, -Cl, -Br y -I), -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R', donde cada R' se selecciona independientemente del grupo constituido por hidrógeno y (C₁-C₆)alquilo.

"Profármaco" se refiere a un derivado de un compuesto activo (fármaco) que requiere transformación en las condiciones de uso, tal como en el interior del cuerpo, para liberar el fármaco activo. Los profármacos son frecuentemente, pero sin carácter necesario, farmacológicamente inactivos hasta que se convierten en el fármaco activo. Los profármacos se obtienen típicamente por enmascaramiento de un grupo funcional en el fármaco que se cree es requerido en parte para la actividad con un progrupo (definido más adelante) a fin de formar un pro-resto que sufre transformación, tal como escisión, en las condiciones especificadas de uso para liberar el grupo funcional, y por consiguiente el fármaco activo. La escisión del pro-resto puede tener lugar espontáneamente, por ejemplo por una reacción de hidrólisis, o puede ser catalizada o inducida por otro agente, por ejemplo por una enzima, por la luz, por los ácidos, o por un cambio o exposición a un parámetro físico o ambiental, tal como un cambio de temperatura. El agente puede ser endógeno a las condiciones de uso, tal como una enzima presente en las células a las cuales se administra el profármaco o las condiciones ácidas del estómago, o puede suministrarse exógenamente.

Una gran diversidad de progrupos, así como los pro-restos resultantes, adecuados para enmascaramiento de grupos funcionales en los fármacos activos a fin de producir profármacos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un grupo funcional hidroxilo puede enmascarse como un pro-resto sulfonato, éster o carbonato, el cual puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo hidroxilo. Un grupo funcional amino puede enmascarse como un pro-resto amida, carbamato, imina, urea, fosfenilo, fosforilo o sulfenilo, el cual puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo amino. Un grupo carboxilo puede enmascarse como un pro-resto éster (con inclusión de silil-ésteres y tioésteres), amida o hidrazida, el cual puede hidrolizarse *in vivo* para proporcionar el grupo carboxilo. Otros ejemplos específicos de pro-grupos adecuados y sus pro-restos respectivos serán evidentes para los expertos en la técnica.

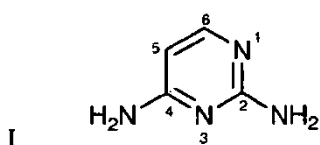
Diversos compuestos que inhiben la actividad de la quinasa Syk o las quinasas Syk/Flt-3 pueden utilizarse en los métodos descritos en esta memoria. Éstos incluyen, entre otros, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos o proteínas, o ácidos nucleicos. Como se utiliza en esta memoria, un "inhibidor de Syk" o "compuesto inhibidor de la quinasa Syk" se refiere a cualquier compuesto que inhibe directamente la actividad de la quinasa Syk por sí mismo o inhibe la interacción de Syk con otras dianas celulares necesarias para el funcionamiento apropiado de Syk en el intervalo de CI₅₀ descrito en esta memoria. Los inhibidores, tal como se utilizan en esta memoria, incluyen la descripción clásica de inhibidores de enzimas, tales como inhibidores competitivos, no competitivos e incompetivos. Compuestos que son inhibidores de Syk son generalmente aquéllos que presentan un valor CI₅₀ con respecto a la actividad de una quinasa Syk, tal como la capacidad de la quinasa Syk para fosforilar un sustrato sintético o endógeno, en un ensayo *in vitro* o celular, comprendido en el intervalo de aproximadamente 5 µM o inferior, aproximadamente 1 µM o inferior, aproximadamente 500 nM o inferior, aproximadamente 100 nM o inferior, aproximadamente 50 nM o inferior, aproximadamente 10 nM o inferior, o aproximadamente 1 nM o inferior. Por ejemplo, compuestos inhibidores de Syk ilustrativos se describen en la Solicitud de Patente U.S. No. de Serie 10/631029 y la Publicación PCT WO 2004/014382. Los expertos apreciarán que los compuestos que exhiben valores CI₅₀ inferiores, tales como los comprendidos en el intervalo de aproximadamente 100 nM, 10 nM, 1 nM, o menores aún, son útiles para los métodos de esta memoria.

En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor puede ser selectivo para la quinasa Syk. Un "compuesto inhibidor selectivo de la quinasa Syk" hace referencia a un compuesto que exhibe selectividad para Syk, la cual se define como la ratio de un valor CI₅₀ para una quinasa de referencia a un valor CI₅₀ para la quinasa Syk en una serie de ensayos definida. Generalmente, el compuesto inhibidor selectivo de la quinasa Syk puede tener una selectividad para la quinasa Syk que es mayor que aproximadamente 10, mayor que aproximadamente 50, mayor que aproximadamente 100, mayor que aproximadamente 1000, o mayor aún. La quinasa de referencia puede ser cualquier actividad de quinasa asociada con trastornos celulares proliferativos, con inclusión de quinasas tales como, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, Aurora-A, AKT, CDK1/ciclinaB, CDK2/ciclinaA, CDK3/ciclinaE, CDK5/p35, CDK6/ciclinaD3, CDK7/ciclinaH/MAT1, CHK1, CHK2, EGFR, c-RAF, RAS, cSRC, Yes, Fyn, Lck, Fes, Lyn, Bmx, FGFR3, GSK3α, GSK3β, P13, IGF-1R, MAPK2, MAPKAP-K2, JNK, MEK1, p70S6K, PAK2, PDGFRα, PDGFRβ, PDK1, PKA, PKCε, PKC, PKD2, VEGF, PRAK, PRK2, ROCK-II, Rsk1, Rsk2, Rsk3, SGK. Diversos ensayos para cada una de las quinasas serán evidentes para el experto. Por ejemplo, las actividades de la quinasa Aurora pueden utilizar sustratos naturales o sintéticos (v.g., péptidos fluorescentes, histona H3), en ensayos *in vitro*, o la medida de productos fosforilados en las células (Walter et al., 2000, Oncogene 19 (42):4206-16). Las actividades de las quinasas pueden detectarse utilizando diversos enfoques que incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, inmunoprecipitación (v.g., Ensayo de la quinasa Cyclax Aurora A; MBL Corp, Woburn, MA, EE.UU.) desplazamiento de movilidad (v.g., Caliper Technologies, Mountain View, CA, EE.UU.), ensayos basados en sustratos de proteínas de fusión autofluorescentes (v.g., Patente U.S. No. 6.248.550), y ensayos basados en FRET (Z-LYTE®; Invitrogen, CA, EE.UU.). Como será apreciado por el experto, pueden utilizarse otras quinasas activas implicadas en proliferación celular aberrante a fin de determinar la selectividad de un inhibidor de quinasas para Syk.

En algunas realizaciones, el compuesto inhibidor para uso en un método para tratamiento de trastornos celulares proliferativos comprende un compuesto inhibidor de las quinasas Syk/Flt-3. Un "compuesto que inhibe las quinasas Syk/Flt-3" o "inhibidor de las quinasas Syk/Flt-3" hace referencia a un compuesto inhibidor de Syk que puede inhibir

también la quinasa Flt-3, por ejemplo por inhibir directamente la actividad de las quinasas Flt-3 por sí mismo o por inhibir la interacción con otras dianas celulares necesarias para el funcionamiento apropiado de Flt-3 dentro del intervalo de CI_{50} descrito en esta memoria. Compuestos que son inhibidores de Syk/Flt-3 son generalmente aquéllos que exhiben un valor CI_{50} con respecto a una actividad de la quinasa Flt-3, tal que la capacidad de la quinasa Flt-3 para fosforilar un sustrato sintético o endógeno, en un ensayo *in vitro* o celular, comprendido en el intervalo de aproximadamente 5 μ M o inferior, aproximadamente 1 μ M o inferior, aproximadamente 500 nm o inferior, aproximadamente 100 nM o inferior, aproximadamente 50 nM o inferior, aproximadamente 10 nM o inferior, o aproximadamente 1 nM o inferior. Por ejemplo, compuestos inhibidores de Syk/Flt-3 ilustrativos pueden encontrarse en el género de compuestos descritos en la Solicitud U.S. No. de Serie 10/631029 y la Publicación PCT WO 2004/014382. Los expertos apreciarán que los compuestos que exhiben valores CI_{50} menores, comprendidos por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 100 nM, 10 nM, 1 nM, o menores aún, son útiles para los métodos de esta memoria.

Diversos inhibidores de quinasas pueden utilizarse en los métodos de esta memoria, debiendo entenderse que incluyen, en caso aplicable, las sales, hidratos, solvatos y N-óxidos de los compuestos inhibidores correspondientes. La solicitud U.S. No. de Serie 10/631029 y la Solicitud PCT Publicada No. WO 2004/014382 describen compuestos de 2,4-pirimidinadiamina y sus diversos derivados. Estos compuestos comprenden generalmente un "núcleo" de 2,4-pirimidinadiamina que tiene la estructura y la convención de numeración siguientes:



Los compuestos están sustituidos en el nitrógeno C2 (N2) para formar una amina secundaria y están sustituidos además opcionalmente en una o más de las posiciones siguientes: el nitrógeno en C4 (N4), la posición C5 y/o la posición C6. Cuando está sustituido en N4, el sustituyente forma una amina secundaria. El sustituyente en N2, así como los sustituyentes opcionales en las otras posiciones, pueden variar ampliamente en carácter y propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, el o los sustituyentes pueden ser un alquilo ramificado, de cadena lineal o cíclico, un heteroalquilo ramificado, de cadena lineal o cíclico, un arilo mono- o policíclico, un heteroarilo mono- o policíclico o combinaciones de estos grupos. Estos grupos sustituyentes pueden estar sustituidos ulteriormente, como se describe en la Solicitud U.S. No. de Serie 10/631029 y la Publicación PCT WO 2004/014382.

Los sustituyentes en N2 y/o N4 pueden estar unidos directamente a sus átomos de nitrógeno respectivos, o pueden estar separados de sus átomos de nitrógeno respectivos por enlazadores, que pueden ser iguales o diferentes. La naturaleza de los enlazadores puede variar ampliamente, y puede incluir virtualmente cualquier combinación de átomos o grupos útiles para separar un resto molecular de otro. Por ejemplo, el enlazador puede ser un puente hidrocarbonado acíclico (v.g. un alquileo saturado o insaturado tal como metano, etano, eteno, propano, prop[1]eno, butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]diene, y análogos), un puente hidrocarbonado monocíclico o policíclico (v.g., [1,2]benceno, [2,3]naftaleno, y análogos), un puente heteroatómico o heteroalquildiilo acíclico simple (v.g., -O-, -S-, -S-O-, -NH-, -PH-, -C(O)-, -C(O)NH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NH-, -S(O)₂NH-, -O-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -O-CH=CH-CH₂-, y análogos), un puente heteroarilo monocíclico o policíclico (v.g., [3,4]furano, piridino, tiofeno, piperidino, piperazino, pirazidino, pirrolidino, y análogos) o combinaciones de tales puentes.

Los sustituyentes en las posiciones N2, N4, C5 y/o C6, así como los enlazadores opcionales, pueden estar sustituidos ulteriormente con uno o más de los mismos o diferentes grupos sustituyentes. La naturaleza de estos grupos sustituyentes puede variar ampliamente. Ejemplos no limitantes de grupos sustituyentes adecuados incluyen alquilos ramificados, de cadena lineal o cíclicos, arilos mono- o policíclicos, heteroalquilos ramificados, de cadena lineal o cíclicos, heteroarilos mono- o policíclicos, halógenos, haloalquilos ramificados, de cadena lineal o cíclicos, hidroxilos, grupos oxo, grupos tioxo, grupos alcoxi ramificados, de cadena lineal o cíclicos, grupos haloalcoxi ramificados, de cadena lineal o cíclicos, grupos trifluorometoxi, grupos ariloxi mono- o policíclicos, grupos heteroariloxi mono- o policíclicos, éteres, alcoholes, sulfuros, tioéteres, sulfanilos (tioles), iminas, grupos azo, azidas, aminas (primarias, secundarias y terciarias), nitrilos (cualquier isómero), cianatos (cualquier isómero), tiocianatos (cualquier isómero), grupos nitroso, grupos nitro, grupos diazo, sulfóxidos, grupos sulfonilo, ácidos sulfónicos, sulfamidas, sulfonamidas, ésteres sulfámicos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, amidinas, formadinas, aminoácidos, acetilenos, carbamatos, lactonas, lactamas, glucosidos, gluconuridos, sulfonas, cetales, acetales, tiocetales, oximas, ácidos oxámicos, ésteres oxámicos, etc., y combinaciones de estos grupos. Grupos sustituyentes que llevan funcionalidades relativas pueden estar protegidos o no protegidos, como es bien conocido en la técnica.

Realizaciones específicas de compuestos inhibidores de la quinasa Syk se describen también en la Solicitud U.S. No. de Serie 10/631029, presentada el 29 de julio de 2003; Solicitud U.S. No. de Serie 10/903263, presentada el 30 de julio de 2004 (Solicitud U.S. No. de Publicación 2005/0234049); Solicitud U.S. No. de Serie 10/903870, presentada el 30 de julio de 2004 (Solicitud U.S. No. de Publicación 2005/0209224); Solicitud U.S. No. de Serie 60/630808; y

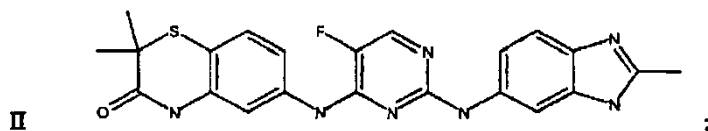
Publicación PCT WO 2004/014382. Formas profármaco de los compuestos de 2,4-pirimidinadiamina se describen en la Solicitud U.S. No. de Serie 11/337049, presentada el 19 de enero de 2006.

Estos compuestos se describen también en los Apéndices A, B, C y D de la Solicitud Provisional U.S. No. de Serie 60/672648, presentada el 18 de abril de 2005.

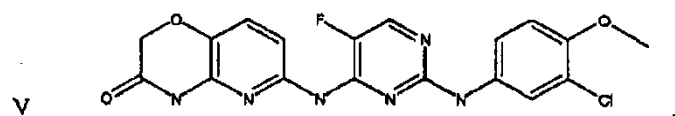
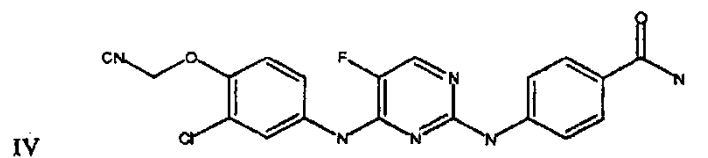
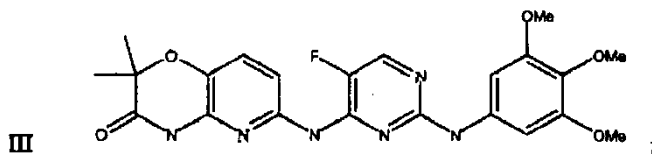
En algunas realizaciones, los compuestos inhibidores de Syk no incluyen realizaciones específicas descritas en la Solicitud U.S. No. 60/494008, presentada el 7 de agosto de 2003, la Solicitud U.S. 60/572534, presentada el 18 de mayo de 2004; y la Publicación de la Solicitud U.S. No. 2005/0113398 (No. de Serie 10/913270).

Estos compuestos se describen también en los Apéndices 1, 2, y 3 de la Solicitud Provisional U.S. No. 60/672648, presentada el 18 de abril de 2005.

Realizaciones ilustrativas de los inhibidores de las quinasas Syk o Syk/Flt-3 basados en 2,4-pirimidinadiaminas para el tratamiento de las afecciones y trastornos descritos en esta memoria incluyen, entre otros, compuestos que tienen las estructuras siguientes:



20



25

y diversas sales, hidratos, solvatos, y N-óxidos de los mismos.

Otras realizaciones ilustrativas de inhibidores de las quinasas Syk o Syk/Flt-3 basados en 2,4-pirimidinadiaminas incluyen, entre otros, N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina (Compuesto VI); N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogeno-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina (Compuesto VII); y diversas sales (v.g., sales de calcio, etc.), hidratos, solvatos y N-óxidos de los mismos.

Los compuestos pueden testarse en diversos ensayos bioquímicos y celulares en cuanto a su efecto inhibitor sobre las quinasas Syk y/o Flt-3. La quinasa Syk fosforila LAT y PLC-γ1, lo que conduce, entre otras cosas, a desgranulación de los mastocitos y/o los basófilos. Se observa también actividad de la quinasa Syk en respuesta a la estimulación de los receptores de las células T. Debe entenderse que cualquiera de estas actividades puede utilizarse para confirmar la actividad de los compuestos inhibidores de Syk. En algunas realizaciones, el ensayo de la quinasa Syk es un ensayo de desgranulación basado en la medida de la liberación del contenido de gránulos después de estimulación con anti-IgE. Estos ensayos incluyen, por ejemplo, medida de la liberación de triptasa, histamina, leucotrieno LTC4, o hexosaminidasa. En otras realizaciones, la actividad se determina por puesta en contacto de una quinasa Syk aislada, o un fragmento activo de la misma con un compuesto inhibidor en presencia de un sustrato de la quina-

sa Syk (v.g., un péptido sintético o una proteína que se sabe es fosforilada por Syk en una cascada de señalización) y evaluación de si la quinasa Syk fosforila el sustrato. Alternativamente, el ensayo puede realizarse con células que expresan una quinasa Syk. Las células pueden expresar la quinasa Syk endógenamente o pueden modificarse por ingeniería genética para expresar una quinasa Syk recombinante. Las células pueden expresar también opcionalmente el sustrato de la quinasa Syk. Células adecuadas para realización de tales ensayos de confirmación, así como métodos de modificación por ingeniería genética de células adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Sustratos adecuados de la quinasa Syk incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, la proteína banda 3 humana (Wang et al., 1999, J Biol Chem. 274(45), 32159-32166); proteína-quinasa C (Kawakami et al., 2003, Proc Natl Acad Sci USA, 100(16):9470-5), tubulina (Peters et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:4755), cortactina (Maruyama et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:6631), y p50/HS1 (Ruzzene et al., 1996, Biochemistry 35:1527). Ejemplos específicos de ensayos bioquímicos y celulares adecuados para confirmación de la actividad de los compuestos inhibidores de Syk se describen en Fox et al., 1998, Protein Science, 7:2249, Solicitud U.S. No. de Serie 10/631029, WO 2004/014382, y las referencias citadas en dichos lugares.

La activación de la quinasa Flt-3 conduce a autofosforilación y fosforilación de cierto número de sustratos celulares que incluyen, entre otros, la inositol-5-fosfatasa que contiene Src-homología-2 (SH2) (SHIP) y una proteína de 100 kD en las células monocíticas THP-1; fosforilación de Shc y Cbl1 en células mieloides; β -arrestina, tirosina-fosfatasa que contiene SH2, y Cbl-b en células pro-B (véase, v.g., Rottapel et al., 1994, Oncogene 9:1755-1765; Zhang et al., 1999, J. Leukoc. Biol. 65:372-380). En algunas realizaciones, la actividad de la quinasa Flt-3 puede determinarse por el uso de anticuerpos para la forma fosforilada de la quinasa Flt-3 (a saber, ensayo de autofosforilación; Kiyoi et al., 1998, Leukemia 12:1333-1337). En algunas realizaciones, la actividad puede determinarse por contacto de una quinasa Flt-3 aislada, o un fragmento activo de la misma, con un compuesto inhibidor en presencia de un sustrato de la quinasa Flt-3 (v.g., un péptido sintético o una proteína que se sabe es fosforilada por Flt-3 en una cascada de señalización). Alternativamente, el ensayo puede realizarse con células que expresan una quinasa Flt-3, sea endógenamente o que están modificadas por ingeniería genética para expresar una quinasa Flt-3 recombinante (v.g., Yamamoto et al., 2001, Blood 97 (8):2434-2439). Las células pueden expresar también opcionalmente el sustrato de la quinasa Flt-3. En algunas realizaciones, las células que expresan Flt-3 pueden examinarse respecto a activación de diversas dianas situadas aguas abajo descritas anteriormente, tales como, por ejemplo, fosfolipasa C- (PLC), la subunidad p85 de fosfatidilinositol-3'-quinasa (PI3K), SHC, SHP-2, SHIP, GRB2, VAV, la quinasa Fyn, la quinasa Src, la proteína de transducción de señales Stat5, y ERK.

La determinación del efecto de los compuestos inhibidores sobre la proliferación celular puede utilizar cualquier número de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las células proliferantes pueden cultivarse convenientemente *in vitro* y tratarse con los compuestos de interés. La capacidad proliferativa en las poblaciones de células puede determinarse utilizando tinción con colorantes (v.g., exclusión con colorante azul tripán; 3,4,5-dimetiltiazol-3,5-difeniltetrazolio (MTT), y annexina V), o técnicas de clasificación celular (v.g. clasificación con yoduro de propidio de células activadas por fluorescencia). Los ensayos *in vivo* para proliferación celular pueden estar basados en el trasplante de células tumorales en animales experimentales, seguido por administración de los compuestos inhibidores. Estos y otros métodos de evaluación de la proliferación celular serán evidentes para el experto.

6.3 Dosificaciones

El o los compuestos activos, o composiciones de los mismos, pueden utilizarse en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad particular de que se trate. El o los compuestos pueden administrarse terapéuticamente para conseguir un beneficio terapéutico o profilácticamente para conseguir un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno celular proliferativo subyacente que se está tratando, v.g., neoplasma linfóide, neoplasma mielóide, tumores asociados a virus, y/o erradicación o mejora de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno subyacente de tal modo que el paciente confirma una mejora en su estado, a pesar de que el paciente pueda estar todavía afligido con el trastorno subyacente. El beneficio terapéutico incluye también la detención o ralentización de la progresión de la enfermedad, con indiferencia de si se consigue mejora.

Para administración profiláctica, el compuesto activo puede administrarse a un paciente que se encuentra en riesgo de desarrollar un trastorno caracterizado por, causado por o asociado con proliferación celular aberrante, tal como los diversos trastornos descritos previamente arriba. Por ejemplo, si un paciente es diagnosticado de un tumor pero no se encuentra indicación alguna de metástasis, los compuestos inhibidores pueden administrarse profilácticamente para inhibir la metástasis del tumor.

La cantidad de compuesto o compuestos inhibidores administrada dependerá de una diversidad de factores, que incluyen, por ejemplo, la indicación particular que se esté tratando, el modo de administración, si el beneficio deseado es profiláctico o terapéutico, la gravedad de la indicación que se esté tratando y la edad y el peso del paciente, la biodisponibilidad del compuesto activo particular, etc. La determinación de una dosis eficaz está totalmente dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Las dosis iniciales pueden estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis inicial para uso en animales puede formularse hasta alcanzar una concentración circulante en sangre o suero del compuesto que

inhibe suficientemente Syk o Flt-3 para reducir la proliferación celular o invasividad de las células tumorales. Alternativamente, una dosis inicial para uso en animales puede formularse para alcanzar una concentración circulante en sangre o suero del compuesto activo que es igual a o mayor que el valor CI_{50} tal como se mide en un ensayo de inhibición de la quinasa Syk o Flt-3. El cálculo de las dosis para alcanzar tales concentraciones circulantes en sangre o suero teniendo en cuenta la biodisponibilidad del compuesto inhibidor particular está perfectamente dentro de las aptitudes de los expertos. Para orientación, se remite al lector a Finl y Woodbury, "General Principles", en: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, capítulo 1, pp. 1-46, 1975, y las referencias citadas en dicho lugar. Las dosis iniciales pueden estimarse también a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Modelos animales útiles para testar la eficacia de los compuestos para tratar o prevenir enfermedades caracterizadas por, causadas por o asociadas con la actividad de la quinasa Syk o la quinasa Flt-3 se describen en esta memoria.

Las cantidades de dosis estarán comprendidas típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día, 200 mg/kg/día, 300 mg/kg/día, 400 mg/kg/día o 500 mg/kg/día, pero pueden ser mayores o menores, dependiendo, entre otros factores, de la actividad del compuesto inhibidor, su biodisponibilidad, el modo de administración y diversos factores expuestos anteriormente. La cantidad y el intervalo de las dosis pueden ajustarse individualmente a fin de proporcionar niveles en plasma del o de los compuestos activos que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico o profiláctico. En los casos de administración local o absorción selectiva, tal como administración local tópica, la concentración local eficaz del o de los compuestos activos puede no ser proporcional a la concentración en plasma. Los expertos podrán optimizar las dosis eficaces sin experimentación excesiva.

El o los compuestos pueden administrarse una vez al día, unas cuantas o varias veces al día, o incluso múltiples veces al día, dependiendo, entre otras cosas, de la indicación que se esté tratando y el criterio del médico prescriptor.

Preferiblemente, el o los compuestos activos proporcionarán beneficio terapéutico o profiláctico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad del o de los compuestos activos puede determinarse utilizando procedimientos farmacéuticos estándar. La ratio de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico (o profiláctico) es el índice terapéutico. Se prefieren compuestos activos que exhiban índices terapéuticos altos.

6.4 Administración

Cuando se utilizan para tratar o prevenir trastornos celulares proliferativos, los compuestos inhibidores de Syk o Syk-Flt-3 pueden administrarse aisladamente, como mixturas de uno o más compuestos activos o en mixtura o combinación con otros agentes útiles para tratamiento de dichas enfermedades y/o síntomas asociados con tales enfermedades. Los compuestos activos pueden administrarse *per se* o como composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos de la invención pueden fabricarse por procesos de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsiónamiento, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La composición farmacéutica real administrada dependerá del modo de administración. Puede utilizarse virtualmente cualquier modo de administración, incluyendo, por ejemplo, la administración tópica, oral, sistémica, por inhalación, inyección, transdérmica, etc.

El compuesto activo puede formularse en las composiciones farmacéuticas *per se*, o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa aquellas sales que retienen sustancialmente la eficacia biológica y las propiedades del compuesto activo y que no son indeseables biológicamente o por cualquier otra razón. Dichas sales pueden prepararse a partir de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos, como es bien sabido en la técnica. Típicamente, dichas sales son más solubles en soluciones acuosas que los ácidos y bases libres correspondientes.

Para administración tópica, el o los compuestos activos pueden formularse como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. como son bien conocidos en la técnica.

Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para administración por inyección, v.g., subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

Preparaciones inyectables útiles incluyen suspensiones, soluciones o emulsiones estériles del o de los compuestos activos en vehículos acuosos o aceitosos. Las composiciones pueden contener también agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, v.g., en ampollas o en envases multidosis, y pueden contener conservantes añadidos.

Alternativamente, la formulación inyectable puede proporcionarse en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, con inclusión pero sin carácter limitante de agua estéril exenta de pirógenos, tampón, solución de dextrosa, etc, antes de su utilización. A este fin, el o los compuestos activos pueden secarse por cualquier método conocido en la técnica, tal como liofilización, y reconstituirse antes de su utilización.

Para administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Dichos penetrantes son conocidos en la técnica.

Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden presentar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de fijación (v.g., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa); cargas (v.g., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (v.g., estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (v.g., almidón de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (v.g. lauril-sulfato de sodio). Las tabletas pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica con, por ejemplo, azúcares o recubrimientos entéricos.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden presentar la forma de, por ejemplo, elixires, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su utilización. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (v.g. jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o aceites comestibles hidrogenados); agentes emulsionantes (v.g. lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (v.g., aceite de almendras, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (v.g., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo, o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener también sales tampón, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes en caso apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse convenientemente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

Para administración bucal, las composiciones pueden presentar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

Para las rutas de administración rectal y vaginal, el o los compuestos activos pueden formularse como soluciones (para enemas de retención), supositorios o ungüentos que contienen bases convencionales de supositorio tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Para administración por inhalación, el o los compuestos activos pueden suministrarse convenientemente en la forma de una pulverización aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, v.g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula que suministre una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de v.g. gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvos del compuesto y una base de polvos adecuada tal como lactosa o almidón.

Para suministro prolongado, el o los compuestos activos pueden formularse como una preparación de acción prolongada, para administración por implantación; v.g., inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular. Así, por ejemplo, el ingrediente activo puede formularse con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (v.g., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas cambiadoras de iones, o como derivados poco solubles; v.g., como una sal poco soluble.

Alternativamente, pueden utilizarse sistemas de suministro transdérmico fabricados como un disco o parche adhesivo que libera lentamente el o los compuestos activos para absorción percutánea. A este fin, se pueden utilizar mejoradores de la permeación para facilitar la penetración transdérmica del o de los compuestos activos. Parches transdérmicos adecuados se describen, por ejemplo, en U.S. Pat. No. 5.407.713.; U.S. Pat. No. 5.352.456; U.S. Pat. No. 5.332.213; U.S. Pat. No. 5.336.168; U.S. Pat. No. 5.290.561; U.S. Pat. No. 5.254.346; U.S. Pat. No. 5.164.189; U.S. Pat. No. 5.163.899; U.S. Pat. No. 5.088.977; U.S. Pat. No. 5.087.240; U.S. Pat. No. 5.008.110; y U.S. Pat. No. 4.921.475.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de suministro farmacéutico. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro que pueden utilizarse para suministrar uno o más compuestos activos. Ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO) pueden emplearse también, aunque usualmente a costa de una mayor toxicidad.

Las composiciones farmacéuticas pueden, en caso deseado, presentarse en un envase o dispositivo de suministro que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contienen el o los compuestos activos. El envase puede, por ejemplo, comprender papel metalizado o lámina de plástico, tal como un envase burbuja. El dispositivo de envase o dispensación puede ir acompañado por instrucciones para la administración.

7. EJEMPLOS

7.1 Ejemplo 1: Efecto del Compuesto Inhibidor de Syk sobre la Transformación de las Células pre-B Inducida por Syk

Experimentos que demuestran la inhibición de la proliferación de las células transformadas por Syk por un compuesto inhibidor de Syk se describen en Wossning, T., Herzog, S., Köhler, F., Meixlsperger, S., Kulathu, Y., Mittler, G., Abe, A., y Jumaa, H., "The protein tyrosine kinase Syk is involved in malignant transformation and leukemia development," (manuscrito en preparación). Los experimentos descritos en el manuscrito se resumen brevemente a continuación.

Variantes Syk aberrantes resultantes de la translocación cromosómica Tel-Syk se testaron en cuanto a su capacidad para transformar células pre-B por transducción retroviral de células pre-B de médula ósea aisladas recientemente con vectores IRES-GFP que expresaban Tel-Syk. La carencia de IL-7 de estos cultivos de células condujo a un enriquecimiento de las células que expresaban Tel-Syk y la generación de líneas de células independientes IL-7 estables, lo que indicaba que la expresión de TEL-Syk puede promover la proliferación y transformación de las células pre-B. La transformación de las células pre-B por la actividad de Tel-Syk se confirmó por inyección de las células TEL-SYK transducidas en ratones RAG/ γ C^{-/-}, que condujo a animales que presentaban síntomas de enfermedad mielodisplásica. Los datos demuestran que las células que expresan Tel-Syk pueden proliferar rápidamente *in vivo*, induciendo con ello leucemia agresiva.

Para testar si la inhibición de la actividad de Syk en las células transformadas con Tel-Syk bloquea la proliferación celular, se testó el efecto del compuesto inhibidor de la quinasa Syk 2,4-pirimidinadiazina **IV** *in vitro* por examen del contenido de DNA de las células tratadas. El compuesto **IV** bloqueaba eficazmente la proliferación de las células pre-B inducidas por Syk y permitía que las células pre-B se diferenciaban, lo que se indicaba por la expresión de la cadena ligera kappa en estas células. Los datos demuestran que la expresión de Syk puede ser requerida para proliferación de las células leucémicas y que el bloqueo de la actividad de la quinasa Syk puede conducir a la inhibición de la proliferación de las células leucémicas.

7.2 Ejemplo 2: Efecto de los Inhibidores de Syk sobre Leucemias Establecidas

Para determinar el efecto del inhibidor de Syk sobre la proliferación de células leucémicas, se utilizaron varias líneas de células tumorígenas pre-B que inducen leucemia después de inyección en ratones. Dado que las células tumorígenas necesitan el receptor de las células pre-B (pre-BCR) para proliferación, y Syk es una proteína crítica para la cascada de señalización pre-BCR, es de esperar que los inhibidores de Syk inhiban la proliferación de estas células tumorígenas pre-B. En un experimento, se examinó la capacidad del compuesto **VI** para bloquear la proliferación utilizando células pre-B transducidas con vectores de expresión Myc y cultivadas en ausencia de IL-7. Las células se inyectaron en ratones RAG/ γ C⁻ + a fin de examinar su capacidad de proliferación *in vivo*. La capacidad de **VI** para bloquear la proliferación se testó *in vitro* utilizando la línea de células transducidas con Myc (FIG. 2A y FIG. 2B).

Se examinó también la capacidad de **VI** para bloquear la proliferación utilizando la línea de células tumorígenas pre-B SLP-65^{-/-}. Se inyectaron las células en ratones RAG/ γ C⁻ +/- a fin de examinar su capacidad para proliferar *in vivo*. La capacidad de **VI** para bloquear la proliferación de la línea de células tumorígena SLP-65^{-/-} pre-B se testó *in vitro* (FIG. 3A y FIG. 3B).

Otras líneas de células leucémicas útiles para examinar el efecto de los compuestos inhibidores de Syk incluyen, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, la línea de células JM1 del linfoma de las células B (ATCC No. CRL-10423), la línea de células de linfoma de Hodgkin RPMI-6666 (ATCC No. CCL-113), el CLON 15 de la línea de células de la leucemia promielocítica HL-60 (ATCC No. CRL-1964), la línea de células de linfoma de Burkitt GL-10 (ATCC No. CRL-2392), la línea de células de leucemia mielógena aguda BDCM (ATCC No. CRL-2740), la línea de células de leucemia mielomonocítica EBV CESS (ATCC No. TIB-190), la línea de células de plasmacitoma/mieloma transformadas con EBV MC-CAR (ATCC No. CRL-8083), y la línea de células de leucemia de las células plasmáticas transformadas con EBV ARH-77 (ATCC No. CRL-1621).

7.3 Ejemplo 3: Evaluación In Vivo de la Forma de Sal de Calcio del Compuesto **VII**, y Titulación de las Células en el Modelo de Injerto de Tumor Intravenoso de la Leucemia Mieloide Aguda (AML) MV4-11 en Ratones Inmunodeficientes NOD-SCID Pretratados con Ciclofosfamida

La mutación FIt-3 ITD ha sido asociada con un mal pronóstico y tasas de remisión reducidas en pacientes afectados con AML, haciendo de la misma una diana atractiva para la intervención terapéutica. Estudios realizados han demostrado que los receptores mutantes FIt-3 ITD se dimerizan de una manera independiente del ligando de FIt-3 y la auto-fosforilación del receptor da como resultado activación constitutiva, proliferación incrementada, e independencia de factores de crecimiento de la célula mutante. Estudios iniciales demostraron que la forma de sal de calcio de **VII** reducía el crecimiento del tumor subcutáneo y prolongaba la supervivencia reduciendo al mismo tiempo la carga

5 tumoral de los ratones inoculados por vía intravenosa (i.v.) con 5 millones de células de leucemia mieloide aguda humana MV4-11 que presentaban la mutación Flt-3 ITD. Este estudio se llevó a cabo para demostrar la eficacia de la administración de **VII** en la inhibición del crecimiento del tumor por tratamiento oral dos veces al día con 40 mg/kg de **VII** o vehículo sobre la progresión de la enfermedad, la gravedad, y la supervivencia resultantes de la inyección i.v. de 5 ó 10 millones de células de leucemia MV4-11 en ratones NOD-SDID pretratados con ciclofosfamida.

7.3.1 Métodos Experimentales

Líneas de células

10 Líneas de células de leucemia: Leucemia mielógena aguda humana (AML) MV4-11 (Suministrador: American Type Culture Collection (ATCC) fueron mantenidas y cosechadas por el Grupo de Oncología en Rigel. Las células se sometieron al test IMPACT en 11-30-04 y eran negativas para Ectromelia, EDIM, Hantaan, virus K, LCMV, LDEV, MAD, mCMV, MHV, MMV, MPV, MTV, Mycoplasma sp., Polyoma, PVM, REO3, Sendai, TMEV y GDVII.

15 Mantenimiento de la línea de células: Las células MV4-11 se mantendrán en medio de Dulbecco modificado por Iscove (Número ATCC®: 30-2005) con L-glutamina 4 mM ajustada para contener bicarbonato de sodio de 1,5 g/l, 80%; suero bovino fetal, 20% (GIBCO BRL Carlsbad, CA), 1% penicilina/estreptomicina (10.000 UI/ml y 10.000 µg/ml) (CellGro Media Tech, Cat #30-002-CI). Se cosecharon las células en la fase de crecimiento logarítmico, se lavaron, y se inyectaron en medio nuevo. Las células MV4-11 se inocularon a razón de 5×10^6 o 10×10^6 células por

20 animal.

Farmacéutica.

25 Las especificaciones de los artículos de test y formulaciones de test utilizadas en este estudio se enumeran en las hojas de formulación siguientes. Las formulaciones de artículo de test y de vehículo fueron realizadas por el departamento de Farmacéutica antes del comienzo de la dosificación (Vehículo (lote: 1024-15-01); 8 mg/ml de sal de calcio de **VII** (lote: 1024-15-03)). La forma de sal de calcio de **VII** se preparó a concentración equivalente de **VI**. Las formulaciones se guardaron a 4°C, se protegieron contra la luz, y se agitaron enérgicamente antes de su utilización.

Evaluación in vivo de la cinética de injerto de las células de leucemia MV411 (AML) administradas i.v. en ratones NOD-S inmunodeficientes, y efecto del Compuesto VII sobre el nivel de injerto									
Número Id. del Articulo de Test	Detalles de Formulación	Conc. (mg/mL)	¿Cálculos Basados en Base Libre o Sal?	Formulación Requerida* (mL)	Volumen Equivalente de Base Libre(mg)	Dosis (ml/kg)	Factor de Dilución*	Dosis (mg/kg)	
Vehículo (0,1% CMC Na - 0,1% Metilparabén - 0,02% Propilparabén - H ₂ O)	Vehículo (0,1% CMC Na - 0,1% Metilparabén - 0,02% Propilparabén - H ₂ O)	0,00	406 Base Libre	198,4	0,00	5,0	1	0	
Sal de Ca de VII	Vehículo (0,1%CMC Na - 0,1% Metilparabén -0,02% Propilparabén -H ₂ O)	16,00	406 Base Libre	198,4	3.174,00	5,0	1	80	

Animales y alojamiento

Se utilizaron para el estudio ratones hembra de aproximadamente 10 semanas de edad, NOD.CB17-Prkdc scid/J (NOD/SCID) (n = 60; DOB 05/30/05; recibidos en fecha 07/19/05 de Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Los ratones NOD-SCID (stock #001303) están disponibles exclusivamente de The Jackson Laboratory y los defectos múltiples en la inmunidad innata y adaptativa exclusivos del ratón NOD-SCID proporcionan un ambiente excelente in vivo para reconstitución con células hematopoyéticas humanas. Aproximadamente 50 ratones recibieron ciclofosfamida y se utilizaron para la parte in vivo de este estudio, mientras que los ratones adicionales se utilizaron como controles sin tumor para la evaluación de la tinción de fondo para el análisis por citometría de flujo de los niveles de injerto. Se utilizaron ratones ligeramente más viejos (> 19 gramos) (en comparación con V050144) para intentar la evitación de muertes prematuras debidas a pérdida excesiva de peso después de la inyección de ciclofosfamida.

Los animales se alojaron a razón de 5 por jaula en jaulas Micro Isolator en bandejas de jaulas ventiladas, provistas de filtros HEPA (Alternative Design, Siloam Springs, AZ). Después de su llegada, los animales se aclimataron durante al menos 4 días laborables antes de su utilización. La temperatura se mantuvo a $72 \pm 5^\circ\text{F}$ ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) con humedad relativa de 35-70%, y se utilizó un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones se alimentaron con comida certificada para roedores (Deans Feed, San Carlos, CA) a discreción. Estaba disponible discrecionalmente agua para beber R.O. tratada en autoclave. Las jaulas y el alimento se mantuvieron en autoclave antes de su utilización. Todos los procedimientos in vivo fueron aprobados por el Rigeo IACUC.

Los ratones NOD-SCID están exentos tanto de insulinitis como de diabetes a todo lo largo de su vida a pesar de los antecedentes propensos a diabetes NOD autoinmune, pero existe una alta incidencia de linfomas tímicos en este stock congénico que limita la duración media de la vida a sólo 8,5 meses en condiciones específicas exentas de patógenos. El provirus Emv-30 en el cromosoma 11 da como resultado una alta frecuencia de timomas que comienzan a los 5-6 meses de edad en los NOD-SCID (3, 4), (5), que limita la duración de los experimentos realizados utilizando ratones NOD-SCID como receptores. En este experimento, se consideró que todos los ratones supervivientes habían completado el estudio cuando los ratones alcanzaron aproximadamente 5 meses de edad (el día 83 del estudio) a fin de limitar los efectos de los timomas espontáneos sobre las variables del resultado en este estudio.

Procedimientos con Animales

Agotamiento de la Médula Ósea para Mejora del Injerto. Al final del periodo de aclimatación de los animales (> 3 semanas en este estudio), los ratones se pretrataron con ciclofosfamida filtrada en condiciones estériles (utilizando un filtro de jeringuilla de $0,22 \mu\text{M}$), preparada en solución salina estéril al 0,9% (Sigma, St. Louis, MO) por inyección intraperitoneal de 150 mg/kg/día durante dos días, seguido por un periodo de descanso de 72 horas antes de la inyección intravenosa (i.v.) de células de leucemia por la vena lateral del rabo, como se describe más adelante.

Inoculaciones de Tumor: El día 0 del estudio, los ratones se inocularon una sola vez por inyección intravenosa en la vena del rabo de 5 ó 10 millones de células de la leucemia humana MV4-11 resuspendidas en 100 microlitros de medio nuevo como se reseña en la Tabla 1.

Dosificación: Después de inocular los ratones con las células humanas MV4-11 (día 0), se inició la dosificación el día 17 del estudio. Los ratones se dosificaron por vía oral (PO) dos veces al día (bid) durante toda la duración del estudio con Vehículo o con 40 mg/kg de VII a 5 ml/kg de volumen de dosis con una separación mínima de 8 horas entre dosis.

Procedimientos experimentales

Modelo de Tumor: Este estudio se diseñó para evaluar los efectos de diversas dosis de VII sobre el injerto de tumor, la progresión de la enfermedad, la gravedad, y la supervivencia global en un modelo de leucemia MV4-11 intravenosa murina utilizando ratones NOD-SCID inmunodeficientes como hospedador con tratamiento de ciclofosfamida para intensificar el injerto de tumor. Datos históricos muestran injertos variables de células tumorales en médula ósea (BM) y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), a pesar de la letalidad uniforme de la inyección de células tumorales como se determina por pérdida de peso > 20%, estado moribundo, pérdida severa de motilidad debido a parálisis de los miembros posteriores o muerte inesperada como puntos finales (estudios VO50123 y VO50144). Se demostró además que la ciclofosfamida es necesaria para la letalidad en este modelo. Estudios publicados que demuestran un tiempo mediano de supervivencia de 51 días en los ratones de control tratados con vehículo demuestran también un injerto variable de la BM en el sacrificio con un intervalo de 2-19% de células humanas detectadas en el compartimiento BM.

Este estudio se condujo en un esfuerzo para confirmar datos de eficacia de un estudio previo, pero también para determinar si inoculaciones de 5 ó 10 millones de células podrían producir inconsistencias similares en el injerto de células tumorales en la médula ósea y la sangre periférica o alterar la mortalidad resultante en estos ratones. Dado que se observó un nivel detectable de injerto en algunos animales tan pronto como 4 semanas después de la inyección de las células tumorales en estudios piloto y que datos históricos de eficacia habían sido determinados con este

régimen, los animales se trataron por vía oral (PO) con vehículo o sal de calcio R945788 a 40 mg/kg conforme a un protocolo de dos veces al día (bid), comenzando por lo general aproximadamente dos semanas después de la inyección de las células tumorales. Los animales siguieron este régimen hasta la eutanasia o hasta el completar el estudio. En este experimento, se consideró que todos los ratones supervivientes habían completado el estudio cuando los ratones alcanzaron aproximadamente 5 meses de edad (día 83 del estudio) a fin de limitar los efectos del desarrollo espontáneo de timoma, que puede observarse en los ratones NOD-SCID comenzando aproximadamente a los 5-6 meses de edad.

Diseño del estudio: El día 0 (8/12/05), los ratones se inyectaron por vía i.v. con células MV4-11 humanas en medio nuevo a razón de 5 ó 10 millones de células por ratón por la vía de la vena lateral del rabo. El día 3 después de la inyección de las células MV4-11 (en 8/15/05), se excluyó un ratón debido a muerte prematura por pérdida excesiva de peso corporal antes de la aleatorización o del tratamiento, debido posiblemente al tratamiento con ciclofosfamida. Los animales restantes se aleatorizaron en grupos de tratamiento utilizando los pesos corporales y se inició la dosificación el día 17 después de la inyección de las células (8/29/05). Los pesos corporales medios de los grupos 1-4 eran $20,66 \pm 0,43$, $20,23 \pm 0,41$, $20,18 \pm 0,54$, y $20,88 \pm 0,59$, respectivamente. Los grupos de tratamiento se reseñan en la Tabla 1:

Tabla 1: Grupos de Tratamiento

Grupo	Línea de Células	Células por inoculación	Tratamiento	N=
1	MV4-11	$5,0 \times 10^6$	Vehículo	12
2	MV4-11	$5,0 \times 10^6$	40mg/kg VII	12
3	MV4-11	$10,0 \times 10^6$	Vehículo	13
4	MV4-11	$10,0 \times 10^6$	40mg/kg VII	13
Se obtuvieron aproximadamente n=10 ratones para tejidos de control no tumorosos, sangre entera, o médula ósea				60

Progresión de la Enfermedad y Gravedad de la Enfermedad: La gravedad global de la enfermedad se determinó a partir de una combinación de pérdida de peso corporal, observaciones clínicas, hallazgos en la necropsia, y cuantificación del injerto de células tumorales en tejidos seleccionados. Los ratones se pesaron 2-3 veces por semana y se calculó la variación porcentual de peso. A la primera indicación de morbilidad, parálisis de los miembros posteriores con atrofia manifiesta, caquexia severa o pérdida de peso mayor que 20%, que implicaba letargo, piel arrugada, etc, como se reseña en el Protocolo IACUC Rigel 6-2002 "Efficacy of Novel Chemotherapeutics in Human/Mouse Tumor Xenograft Models", los animales se retiraron del estudio y se sometieron a eutanasia. Antes del sacrificio, los animales se anestesiaron con CO₂ gaseoso y se recogió sangre por cardiocentesis. La sangre de los animales se transfirió a tubos Microtainer recubiertos con K2EDTA (tapa azul lavanda). La sangre entera se puso indirectamente en hielo y se procesó para tinción por citometría de flujo, como se describe en la sección siguiente. Para evaluar ulteriormente la gravedad de la enfermedad, se anotó cuidadosamente durante la necropsia la localización y descripción de tumores palpables o sospechados en el examen grosero.

Injerto de células tumorales: Para evaluar la carga tumoral, se determinó la distribución de las células tumorales MV4-11 en la médula ósea y la sangre periférica en algunos de los ratones después del sacrificio mediante análisis por citometría de flujo utilizando tinción con marcadores superficiales humanos y de ratón.

La extensión del injerto tumoral se evaluó en algunos ratones por aislamiento de los fémures y/o las tibias después del sacrificio. La médula ósea (BM) se aspiró en tubos Eppendorf limpios con 1 ml de PBS fría y se retuvo en hielo antes de la tinción fluida. Todos los tejidos o tumores restantes se fijaron en formalina tamponada al 10% para histopatología e inmunohistoquímica (IHC). Se obtuvo también sangre periférica por punción cardiaca y se puso en tubos Microtainer recubiertos con K2EDTA (púrpura). Se lisaron los glóbulos rojos y se lavaron las muestras, dejando únicamente células mononucleares (PBMC) para la tinción por citometría de flujo y el análisis a fin de determinar el nivel de injerto de células tumorales.

Para identificar las células tumorales MV4-11 humanas, muestras de BM y PBMC se tiñeron con anticuerpos específicos para los marcadores de la superficie celular CD45 de ratón, CD45 humano, HLA humano, y marcadores de la superficie celular D33 humano. La tinción por citometría de flujo y el análisis se realizaron luego utilizando esta estrategia de marcadores múltiples a fin de identificar y cuantificar el porcentaje de células de leucemia humana MV4-11 presente en las muestras seleccionadas aleatoriamente de los animales tratados con VII y los tratados con vehículo (Apéndices 5 y 6). El porcentaje de células humanas MV4-11 se definió como el número de eventos CD33+ HLA+ del total de eventos (definido como la suma de eventos CD33+ HLA+ humanos y CD45+ murinos). Se hicieron toda clase de esfuerzos para recoger y analizar todos los animales en el estudio. Sin embargo, debido a la naturaleza brusca de la muerte en los ratones tratados con vehículo en este modelo, se dispuso de menos muestras para el

análisis y el número de animales era variable entre los grupos. Para detalles de la preparación de las células y el procedimiento de tinción de flujo y análisis, véanse los Apéndices 5 y 6.

5 Análisis Estadísticos: La supervivencia de los ratones se evaluó por el método del producto límite de Kaplan-Meier como determinación de la gravedad relativa de la enfermedad (n = 18-20 animales/grupo) utilizando el paquete de software GraphPad Prism 4.0®. En los casos en que fue posible, se calcularon también análisis adicionales de curvas de supervivencia que incluían el test Log Rank (Mantel-Haenszel) (valor p de dos colas) para comparación de curvas, ratio de riesgo para la cinética de supervivencia, y la supervivencia global mediana, utilizando Prism 4.0®. Todos los animales supervivientes al final del estudio (día 83) se declararon confirmados para propósitos estadísticos en el análisis Prism®. La estadística de riesgo, definida como la pendiente de la curva de supervivencia, es una medida de la rapidez con que mueren los individuos; por consiguiente, la ratio de riesgo consignada es una comparación de la tasa de muerte entre dos grupos. Por ejemplo, si la ratio de riesgo es 2,0, entonces la tasa de muerte en un grupo es doble que la del otro grupo. En general, Prism 4.0® utiliza los cálculos estándar que se detallan en D.G. Altman, Practical Statistics for Medical Research, 1991, Chapman y Hall. Todos los resultados se expresan como valor medio ± SEM, a no ser que se indique otra cosa.

10 Adicionalmente, el aumento porcentual en la duración de vida (% ILS) se determinó utilizando el día de muerte mediano calculado para cada grupo comparado con el grupo de control de vehículo utilizando la ecuación siguiente, en la que DOD se define como día de muerte:

$$20 \quad \% \text{ ILS} = (\text{DOD}_{\text{tratado mediano}} - \text{DOD}_{\text{vehículo mediano}}) / \text{DOD}_{\text{vehículo mediano}} * 100$$

25 Los ratones tratados con 40 mg/kg de **VII** tenían un tiempo de supervivencia mediano indefinido, dado que números inadecuados de ratones (< 50%) habían expirado antes de la finalización del estudio; por esta razón, los cálculos de % ILS suponían una supervivencia mediana máxima de 80 días para este grupo y se designaron como mayor que el valor calculado.

30 Los datos de injerto se analizaron utilizando un ANOVA de una sola vía, a no ser que se detectaran varianzas desiguales por el test de Bartlett. En este caso, se realizó un test t de Student con dos colas no pareado utilizando una corrección de Welch para tener en cuenta varianzas desiguales. Se realizó normalización del porcentaje de células CD33+ HLA+ para el número total de células. Las células tumorales medias porcentuales se determinaron utilizando la ecuación siguiente para cada muestra y determinando luego la media de estos valores. El número total de células de ratón se determinó utilizando un solo marcador de la superficie celular, CD45 murino y el número total de eventos humanos se determinó utilizando los marcadores duales de superficie humanos CD33 y HLA.

$$35 \quad \text{Porcentaje de Células Tumorales} = [(\# \text{ eventos positivos duales CD33+ HLA+}) / (\# \text{ total de eventos cD45+ murinos y \# CD33+ HLA+})] * 100$$

40 Debido a la naturaleza brusca de la muerte en los ratones tratados con vehículo en este modelo, se dispuso de pocas muestras para el análisis, lo que limitaba la posibilidad de los autores de la invención para conseguir la significación estadística. Se consiguieron un tamaño de muestra y un muestreo aleatorio suficientes con los ratones tratados con **VII**; por esta razón, las comparaciones se realizaron entre ratones tratados con 20, 40 y 80 mg/kg de **VII** y se realizaron las estadísticas como se ha descrito arriba.

45 Para las variables categóricas tales como el número total de animales que presentaban tumores por grupo, los valores p reflejan los resultados de una comparación de grupos tratados frente a grupos de vehículo utilizando un test Fisher's Exact de dos colas con un intervalo de confianza de 95% realizado también con el paquete de software GraphPad Prism 4.0®.

60 7.3.2 Resultados

Efecto del Tratamiento con el Compuesto VII sobre la Supervivencia: Globalmente, los animales tratados con **VII** demostraron una supervivencia prolongada y números reducidos de masas tumorales palpables en el examen realizado durante la necropsia. Los ratones tratados con vehículo inoculados con 5 millones de células MV4-11 tenían un tiempo medio de supervivencia de 54 días comparado con 79 días en los ratones tratados con 40 mg/kg de **VII**. Los animales tratados con vehículo inoculados con 10 millones de células tumorales tenían un tiempo medio de supervi-

vencia de 54 días con día mediano de muerte indefinido para los ratones tratados con 40 mg/kg de **VII** (> 83 días). Los ratones tratados con 40 mg/kg de **VII** en el grupo de 10 millones de células MV4-11 tenían un tiempo mediano de supervivencia indefinido, dado que números inadecuados de ratones (< 50%) habían expirado antes de la finalización del estudio; por esta razón, los cálculos de % ILS supusieron una supervivencia mediana máxima de 83 días para este grupo y se designaron como mayor que el valor calculado. Se observaron diferencias significativas en la supervivencia global entre los animales tratados con **VII** y los tratados con vehículo ((LogRank $p < 0,0022$ y % ILS = 45 % para 40mg/kg **VII** con 5 millones de células, LogRank $p < 0,0001$ y % ILS > 54% para 40mg/kg **VII** con 10 millones de células (suponiendo DOD mediano = 83 para este grupo)).

Tabla 2: Día Mediano de Muerte (DOD) y Aumento Porcentual en Duración de Vida (% ILS) de los Ratones NOD-SCID Portadores de Tumores MV4-11

Título de Células	Tratamiento	DOD mediana	% ILS*	Ratio de riesgo	Valor P de LogRank
MV4-11					
5E6	Vehículo	54	NA	NA	NA
5E6	40mg/kg VII	79	45	3,5	0,0022
10E6	Vehículo	54	NA	NA	NA
10E6	40mg/kg VII	No definida (>83)	>54%**	7,6	<0,0001

NA = no aplicable

* Comparado con el control de vehículo (DOD mediano = 54 días para ambos)

** Supone un día mediano de muerte = 83

El día 83, no quedaba superviviente alguno en los grupos tratados con vehículo. En contraste, los ratones del grupo tratado con **VII** inyectados con 5 y 10 millones de células MV4-11 tenían 5 y 9 ratones supervivientes, respectivamente. Más del 50% de los ratones sobre vivían el día 83 en el grupo de 10 millones de células tratado con **VII** a 40 mg/kg, en comparación con 0% de supervivencia de los controles de vehículo.

Efecto del Compuesto **VII** sobre la Gravedad de la Enfermedad y la Frecuencia y Distribución de los Tumores. Eran evidentes diferencias fenotípicas significativas cuando se comparó la progresión de la enfermedad de los animales tratados con vehículo y con **VII**. En la necropsia, se observaron tumores palpables en los animales tratados con vehículo en diversos ganglios linfáticos (LN), en la médula espinal en la región más baja próxima a la vena cava inferior (posible LN), en la pared del tórax y rodeando la caja torácica y el esternón, cerca de la tráquea, el área mandibular y la garganta (presumiblemente glándula salivar y LN afin). Se encontraron también tumores en el riñón, ovario y corazón. Adicionalmente, se encontraron tumores muy grandes alrededor del hueso en muchos casos en el lomo y en las extremidades anteriores y posteriores. Se observó que algunos ratones tenían cerebros blandos y lisos o tumor obvio, y un ratón tenía un ojo notablemente dilatado que parecía presentar tumor en la necropsia, análogamente a varios ratones del modelo de leucemia MOLM13 en un estudio inicial.

Los animales tratados con vehículo manifestaban parálisis de los miembros posteriores tan prematuramente como a los 42 días después de la inyección de MV4-11 en el grupo de 5 millones de células y 48 días en el grupo de 10 millones de células. En la necropsia, se observaron tumores palpables en los animales tratados con vehículo en localizaciones similares a las de los estudios previos. En total, 8 de 8 ratones inoculados con 5 millones de células tumorales tenían masas tumorales palpables en la necropsia, teniendo muchos ratones sitios anatómicos múltiples identificados que presentaban tumores. Cinco ratones del grupo tratado con vehículo habían muerto, y de 4 de estos ratones no pudo obtenerse informe de necropsia debido a la debilitación avanzada, dando como resultado sólo 8 necropsias totales en este grupo. Al final del estudio (día 83 después de la implantación de MV4-11), 12 de 12 animales tratados con vehículo habían interrumpido el protocolo, encontrándose 5 de los animales muertos, 3 de ellos moribundos después del examen, dos se sacrificaron por pérdida de peso corporal mayor que 20%, y 2 se sacrificaron por HLP asociada con atrofia severa.

Análogamente, 11 de 12 ratones tenían masas tumorales visibles, identificándose en muchos casos sitios múltiples en los ratones tratados con vehículo inoculados con 10 millones de células. Un total de 1 animal tratado con vehículo había muerto y no pudo realizarse necropsia de 1 debido a debilitación avanzada, dando como resultado un total de 11 necropsias en este grupo. A la finalización del estudio (día 83 después de la implantación de MV4-11), 13 de los 13 animales tratados con vehículo habían interrumpido el estudio, encontrándose muerto uno de los animales, 3 de ellos moribundos en el momento del examen, 7 presentaban una pérdida de peso corporal mayor que 20% y 2 se sacrificaron por HLP asociada con atrofia severa.

En contraste acusado, los ratones tratados con 40 mg/kg de **VII** demostraron muy pocos tumores, con sólo 3 de un total de 11 animales sometidos a necropsia en el grupo de 5 millones de células y presentando 7 de 13 animales en el grupo de 10 millones de células algunos tumores visibles o palpables. La mayoría de estos animales en los grupos tratados presentaban tumores mucho más pequeños que los animales tratados con vehículo. Los tumores estaban localizados en sitios anatómicos similares y, a la finalización del estudio, éste se había interrumpido en 7 de 12 animales en el grupo de 5 millones de células tratado con 40 mg/kg de **VII**, encontrándose muertos 2 de los animales, estando moribundo 1 animal en el momento del examen; 4 presentaban una pérdida de peso corporal mayor que 20%, y no se sacrificó ninguno por HLP. Análogamente, los animales tratados con 40 mg de **VII** inoculados con 10 millones de células MV4-11 presentaban muy pocos tumores, teniendo algunos ratones glándulas salivares engrosadas o LN ligeramente engrosados. A la finalización del estudio, sólo se había interrumpido el mismo en 4 de los 13 ratones tratados con 40 mg/kg de **VII** a la fecha, presentando 3 ratones una pérdida de peso corporal mayor que 20%, y encontrándose 1 animal moribundo en el momento del examen. Globalmente, los ratones tratados con **VII** exhibían una reducción significativa en el número total de tumores, el tamaño relativo de los tumores observado en la necropsia, y la gravedad global de la enfermedad en este estudio, presentando el tratamiento con 40 mg/kg de **VII** eficacia similar a la observada en un estudio inicial.

Efecto del Compuesto **VII** sobre el Injerto de Células Tumorales MV4-11 en la Médula Ósea (BM) y la Sangre Periférica (PB): Para correlacionarlo con un estudio previo, se examinó también el nivel de injerto de MV4-11 en la médula ósea o en sangre periférica en algunos animales a la finalización. A pesar de los mejores esfuerzos de los inventores, debido a la naturaleza brusca de la muerte en los ratones tratados con vehículo en este experimento, algunas muestras no estaban disponibles para análisis. Al contrario que en el estudio inicial, se observó una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje medio de células tumorales MV4-11 en la médula ósea y la sangre periférica de los animales tratados con **VII** en el momento del sacrificio cuando se comparó con los animales tratados con vehículo, con indiferencia del título de células inoculadas (Tabla 3).

Los ratones tratados con vehículo inoculados con 5 millones de células tenían 25% y 61% de células tumorales humanas CD33+/HLA+ en BM (n = 6) y PB (n = 4), respectivamente. En contraste, los ratones tratados con **VII** inoculados con 5 millones de células tenían 1% y 0,6% de células tumorales humanas CD33+/HLA+ en BM (n = 8) y PB (n = 8), respectivamente (para BM p = 0,13 y p = 0,02 para PB para 40 mg/kg frente al control de vehículo). El grupo de 10 millones de células tratado con vehículo tenía 13% y 45% de células tumorales humanas CD33+/HLA+ en BM (n = 8) y PB (n = 8), respectivamente. En contraste, el grupo de 10 millones de células tratado con **VII** tenía 5% y 3% de células tumorales humanas CD33+/HLA+ en BM (n = 13) y PB (n = 11), respectivamente (para BM p = 0,05 y p = 0,007 para PB para 40 mg/kg frente al control de vehículo).

Tabla 3: Porcentaje Medio de Células Tumorales Humanas MV4-11 en la Médula Ósea y la Sangre Periférica de los Ratones NOD-SCID en el momento del Sacrificio

A.	Médula ósea: % Medio de Células Tumorales				
	Naïf* (sin células)	5 millones de células MV4-11		10 millones de células MV4-11	
		Vehículo	40mg/kg VII	Vehículo	40mg/kg VII
Número de valores (n=)	6	6	8	9	13
% Medio de células tumorales*	0-85	24,51	1,03	12,60	5,21
Desviación estándar	0,65	31,64	1,52	8,44	7,70
Error estándar	0,27	12,92	0,54	2,81	2,14
Significación estadística (frente a los controles de Vehículo)***	--	--	p=0,13	--	p=0,05
B.	Sangre Periférica: % Medio de Células Tumorales				
	Naïf* sin inyección de células	5 millones de células MV4-11		10 millones de células MV4-11	
		Vehículo	Vehículo 40mg/kg VII	Vehículo	40mg/kg VII
Número de valores (n=)	6	4	8	9 (8)	12 (11)
% Medio de células	0,05	61,12	0,59	(44,68)	(2,80)

A.	Médula ósea: % Medio de Células Tumorales				
	Naíf* (sin células)	5 millones de células MV4-11		10 millones de células MV4-11	
		Vehículo	40mg/kg VII	Vehículo	40mg/kg VII
tumorales*				50,57	10,32
Desviación estándar	0,08	26,78	0,76	(30,99) 33,95	(4,76) 26,46
Error estándar	0,03	13,39	0,27	(10,96) 11,32	(1,44) 7,64
Significación estadística (frente a los controles de Vehículo)***	--	--	p=0,02	--	(p=0,007) p=0,01

Los números que figuran entre paréntesis reflejan los valores ajustados para excluir dos muestras de PB sospechosas de estar contaminadas (n = 1 en cada grupo). Se observó que estas muestras presentaban exudados de aspecto blanco lechoso al intentar la recogida de sangre por cardiocentesis, y se observó más tarde que presentaban tumores cerca del corazón o el timo durante la necropsia. Los dos valores sospechosos exhibían 98 y 93% de células tumorales en los grupos de vehículo y 40 mg/kg de **VII** (10 millones de células), respectivamente.

* El porcentaje medio de células tumorales se define como # de eventos CD33+ HLA+/eventos totales; donde eventos totales = # eventos de células CD45+ murinas + # eventos CD33+ HLA+.

** Las muestras naíf se tiñeron durante 3 días separados entre 3 estudios separados. Los valores reflejan el límite de detección del ensayo, dado que los ratones no se inyectaron con células tumorales MV4-11.

*** La significación estadística se determinó utilizando un test de Student con dos colas no pareado con la corrección de Welch para tener en cuenta varianzas desiguales en los datos, incluso en el caso de que el tamaño de la muestra fuese demasiado pequeño para el test de Bartlett para varianza igual.

Estos datos demuestran reducciones de 96% y 59% (grupos inyectados con 5 y 10 millones de células, respectivamente) en la carga tumoral en BM en el caso de tratamiento con **VII** cuando se comparan con el grupo de vehículo, y reducciones de 99% y 94% en el injerto de células tumorales en el caso de tratamiento con **VII** en la PB (5 y 10 millones de células, respectivamente) cuando se comparan con el grupo de vehículo (Tabla 4).

Tabla 4: Sumario de los Datos de Injerto

Grupo ID	% Reducción frente al Control de vehículo	
	Médula Ósea	Sangre periférica
5 millones de células, VII 40 mg/kg PO, bid diariamente	96	99
10 millones de células, VII 40 mg/kg PO, bid diariamente	59	80 (94)

Los números que figuran entre paréntesis reflejan los valores ajustados para excluir muestras sospechosas de contaminación (n = 1 en cada grupo de 10 millones de células PB). Se observó que estas muestras presentaban exudados de aspecto blanco lechoso al intentar la recogida de sangre por cardiocentesis, y se observó subsiguientemente que presentaban tumores cerca del corazón o el timo durante la necropsia. Los dos valores sospechosos exhibían 98 y 93% de células tumorales en los grupos tratados con vehículo y 40 mg/kg de **VII** (10 millones de células), respectivamente.

Farmacocinética del Compuesto **VII** en los Ratones NOD-SCID: Se generaron datos PK iniciales en ratones NOD-SCID en un estudio inicial antes de la dosificación en este estudio. Los resultados indican que los aumentos proporcionales a la dosis en los niveles en plasma de **VI** con dosis y exposiciones a 20, 40 u 80 mg/kg se limitaban a 2-4 horas después de la dosis con niveles en plasma de **VI** virtualmente indetectables a las 6 horas después de la dosis en todos los ratones hembra. Los machos exhibían mayores exposiciones con dosis equivalentes y mayor duración de los niveles de **VI** en el plasma cuando se compararon con las hembras.

Debido a precipitados observados en formulaciones de estudio preparadas en el estudio inicial y otros estudios, se obtuvieron datos PK adicionales utilizando soluciones de dosificación restantes después de la finalización del estudio.

5 dio. Los ratones hembra NOD-SCID (n = 4) se dosificaron con 40 mg/kg de solución de dosis de **VII** y plasma obtenido 1 hora después de la dosis. Como se muestra en la Tabla 5, los datos PK utilizando las formulaciones restantes eran moderadamente variables entre los cuatro animales con un valor del Coeficiente de Variación porcentual (% CV) de 25%. Las concentraciones de **VI** en plasma obtenidas para exposiciones de 1 hora eran similares a los valores obtenidos en un estudio previo de **PK**, lo que indicaba que estas formulaciones eran comparables.

10 Tablas 5A y 5B: Administración PO de Sal de Calcio de **VII**: Concentración Media de Compuesto **VI** en Plasma (ng/ml).

Tabla 5A

Dosis (mg/kg)	20	40	80	20	40
Grupo	1	2	3	4	5
Tiempo (horas)	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Macho
0,25	3717	5140	3847	1872	3587
0,5	2240	3597	7433	3377	2860
1	1737	5497	7267	3280	5250
2	1438	2823	8193	2130	6370
4	55.0	201	2529	1209	1730
6	13.0	105	465	454	1909

15 **Tabla 5B**

Dosis (mg/kg)	20	40	80	20	40
Grupo	1	2	3	4	5
Parámetro	Hembra	Hembra	Hembra	Macho	Macho
Dosis, mg/kg	20	40	80	20	40
C _{-max}	3717	5497	8193	3377	6370
T _{-max}	0,25	1,00	2,00	0,50	2,00
AUC _{last} , ng*h/ml	5351	11498	27013	10261	20831
AUC _{inf} , ng*h/ml	5362	11625	27662	11434	27170
T _{1/2} , h	0,59	0,84	0,97	1,79	2,30

20 **Tabla 6: Datos PK en Ratones NOD-SCID Utilizando Soluciones de Dosificación Restantes:**

N=3 animales por grupo	
Dosis =>	40 mg/kg VII
Conc.Media (ng/mL VI)	4210
Desviación Estándar	1035
Coeficiente de Variación (%)	25

7.3.3 Conclusiones

25 La administración intravenosa de células tumorales MV4-11 a 10 millones de células por ratón daba como resultado una mayor diseminación de los tumores en sitios anatómicos múltiples en comparación con 5 millones de células. Además, los ratones inoculados con 10 millones de células tenían más consistentemente niveles altos de injerto en la médula ósea y la sangre periférica. La administración de 40 mg/kg de **VII** a los ratones que presentaban tumores

MV4-11 diseminados demostró una eficiencia notable cuando se comparó con los ratones tratados con vehículo con respecto a supervivencia global y secuelas relacionadas con la enfermedad con indiferencia del título de células. Adicionalmente, **VII** era bien tolerado por los ratones NOD-SCID durante más de 60 días en este estudio y las formulaciones utilizadas parecían adecuadas para conseguir exposiciones sistémicas similares como en el estudio **PK** previo.

En resumen, los ratones tratados con **VII** demostraban reproduciblemente una reducción relacionada con el fármaco en el número de tumores totales identificados, el número total de animales con tumores, y la gravedad de la enfermedad tal como se medía por pérdida de peso corporal, condición durante la necropsia, y otras observaciones clínicas in vivo. Los datos de este estudio eran similares a un estudio de eficacia previo, que demostraba una prolongación repetida de la supervivencia de los ratones portadores de MV4-11 con el tratamiento de **VII**. Adicionalmente, los ratones tratados con **VII** demostraban menos células tumorales MV4-11 detectables en la médula ósea y la sangre periférica en comparación con los controles de vehículo. Estos datos sugieren que los inhibidores de las quinasas Syk/Flt-3 pueden ser una terapéutica valiosa para el tratamiento de los pacientes leucémicos portadores de **Flt-3-ITD** u otras leucemias asociadas con mutaciones de Flt-3.

7.4 Ejemplo 4: Inhibición de la Actividad Constitutiva de Flt-3 en Lisados de Células Tumorales MV4-11

Estudios iniciales habían demostrado que el tratamiento de células AML humanas MV4-11 daba como resultado la inhibición de la fosforilación constitutiva de Flt-3. Con arreglo a estos datos, la fosforilación de Flt-3 frente a Flt-3 total se evaluó *ex vivo* en lisados de células tumorales procedentes de ratones de este estudio seleccionados aleatoriamente utilizando inmunoprecipitación (IP) de Flt-3 humana y subsiguiente. El análisis por transferencia Western de Flt-3 fosforilada se llevó a cabo como sigue.

7.4.1 Protocolo Experimental

Preparación de los Lisados de Tumor

1. Recoger el tumor lo antes posible.
2. Pulverizar el tumor congelado en nitrógeno líquido.
3. Pesar y normalizar en 250 mg/ml de tampón RIPA enfriado en hielo (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) que contiene un cóctel de inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasa (Sigma, P5726, 1 ml/100 ml de tampón de lisis).
4. Homogenizar en hielo.

Microcentrifugar y recoger el sobre nadante claro que es el lisado de tumor.

Ensayo BCA para Medir la concentración de proteínas: Se obtuvo el kit de ensayo BCA de Pierce Prod #23227)

1. Preparación del estándar BSA: 2000 µg/ml → 1500 µg/ml → 100 µg/ml → 750 µg/ml → 500 µg/ml → 250 µg/ml → 125 µg/ml → 25 µg/ml
2. Prediluir la muestra de test con PBS fría (lisado de tumor, dilución 1:20)
3. 200 µl solución de trabajo BCA + 25 µl estándar/muestra, incubar a 37°C durante 30 min.
4. Enfriar la placa y leer la DO a 570 nm.

Inmunoprecipitación

1. Se toma 1 mg de lisado de tumor y se añaden 2 µg de anticuerpo primario (Anti-Flt-3 S-18, Santa Cruz, # sc-480), y se ajusta el volumen a 500 µl con tampón de lisis. Se incuba con agitación suave mediante sacudidas durante 1 h a 4°C.
2. Se añaden perlas de proteína A/G plus-agarosa (Santa Cruz, SC-2003) 40 µl. Se incuba con agitación suave mediante sacudidas durante 1 h a la temperatura ambiente (RT).
3. Se somete a microcentrifugación durante 30 segundos a 4°C. Se lava el sedimento 3 veces con 500 µl de tampón de lisis 1X. Se mantiene en hielo durante los lavados.
4. Se suspende de nuevo el pellet con 30 µl de tampón de carga 2X Tris-glicina SDS + 5 µl de agente reductor 10X (Invitrogen).

5. Se calienta la muestra a 95-100°C durante 5 minutos.

6. Se guarda la muestra a -80°C.

5

Procedimiento de Transferencia Western

1. Se cargan 20 µl de la muestra en gel de Tris-glicina al 8%.

10

2. Se ejecuta en tampón de ejecución 1X Tris-glicina SDS.

3. Se transfiere a una membrana de PVDF en tampón de transferencia 1X Tris-glicina.

15

4. Se bloquea en 1% BSA/TBST (TBS + 0,1% de Tween-20) a temperatura ambiente durante 1 h.

5. Se añade anticuerpo primario 1:5000 durante una noche a 4°C.

Anti-fosfotirosina Clon 4G10 (monoclonal de ratón, Upstate, # 05-321).

20

Anti-fosfo-Flt-3 (Tyr 591) mAb de ratón, Cell Signaling, # 3466S)

6. Se lava durante 2 horas en TBST.

25

7. Segundo anticuerpo anti-ratón IgG-HRP (Amersham, NA931V) 1:5000 en 5% leche/TBST (Bloqueador de Grado Transferencia, leche desnatada en polvo, Bio-Rad, # 170-6404) durante 1 hora. Exposición corta a ECL-plus (Amersham, RPN 2132).

Membranas de Separación de Materias Volátiles y Reexploración

30

1. Se sumerge la membrana en tampón de separación de materias volátiles (Pierce, # 21062) y se incuba a 37°C durante 1 h.

2. Se lava la membrana en TBST durante 15 min, 2 veces.

35

3. Se bloquea la membrana con 1% BSA/TBST durante 1 h.

4. Se añade anti-Flt-3 1:5000 (Santa Cruz, # sc-480) en 5% leche/TBST, y se incuba durante una noche a 4°C.

40

5. Se lava durante 2 h en TBST.

6. Segundo Ab anti-conejo IgG-HRP (Amersham, NA934V) 1:5000 en 5% leche/TBST a la temperatura ambiente durante 1 h.

45

7. Exposición breve a ECL-plus.

Además, se reexploró la transferencia para los niveles totales de Flt-3. La fosforilación constitutiva de Flt-3 se redujo en los tumores de los animales tratados con 40 mg/kg de **VII** de una manera dependiente de la dosis cuando se comparó con los controles tratados con vehículo.

50

7.4.2 Análisis de la Histona H3 Fosforilada de Aloinjertos de Tumor MV4-11

55

La proliferación se evaluó ex vivo en secciones de tumor fijadas en formalina de 3 ratones de este estudio seleccionados aleatoriamente utilizando tinción inmunohistoquímica de la histona H3 fosforilada específica de humanos (phH3) como marcador para la proliferación de células tumorales. La expresión de phH3 humana se redujo en las secciones tumorales de una manera dependiente de la dosis después del tratamiento con **VII**. Cuando se comparó con los aloinjertos de tumor MV4-11 de ratones tratados con vehículo, el tratamiento con 20 y 40 mg/kg de **VII** dio como resultado un 53% y 71% de inhibición de la tinción con phH3, respectivamente. Estos datos indican que la inhibición por **VII** reducía la capacidad proliferativa de los tumores MV4-11 in vivo, en correlación con los volúmenes reducidos de tumor observados durante la parte de estudio in vivo. La proliferación reducida se debe probablemente a una fosforilación constitutiva reducida de Flt-3, dado que se ha demostrado que esta actividad es necesaria para la supervivencia de las células MV4-11 in vitro.

60

7.4.3 Inhibición de los Eventos de Señalización Aguas Abajo

La tinción inmunohistoquímica adicional de secciones de tumor de ratones tratados durante 26 días con 40 mg/kg de **VI** demostró una fosforilación reducida de STAT5 y ERK1/2, que son moléculas que se encuentran aguas abajo en el camino de señalización de Flt-3:ITD en las células MV4-11 (FIG. 11).

5 7.5 Ejemplo 5: Examen del Compuesto **VI** sobre las Células de Leucemia Mielógena Aguda y Comparación con el Inhibidor de Quinasa AG1296

10 Células AML o transfectantes 32D se trataron durante 48 h (AML) o 24 h (32D) con **VI** 1 μ M, y se determinó el aumento en el % de células apoptóticas utilizando tinción con Annexina V y PI. Los datos demuestran que las células AML que albergan Flt-3 ITD son singularmente sensibles a la apoptosis inducida por **VI**. Análogamente, 32D transfectados con ITD o Flt-3 TDK mutado puntualmente sufren más apoptosis a las 24 h que las células 32D transfectadas con Flt-3 de tipo salvaje.

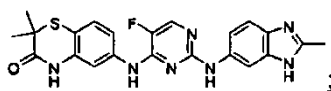
15 Las definiciones que anteceden de realizaciones específicas de la presente invención se han presentado para propósitos de ilustración y descripción.

REIVINDICACIONES

5 1. Un compuesto que es un compuesto inhibidor de la quinasa Syk para uso en el tratamiento de un trastorno celular proliferativo, en donde el compuesto es

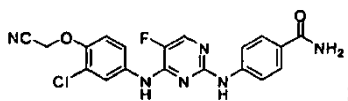
(a) N2-(2-metil-1-benzo[d]imidazol-6-il)-N4-(2,2-dimetil-3(4H)-oxo-2H-benzo[b][1,4]tiazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina

10



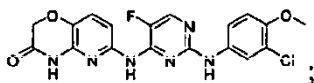
(b) N2-(4-carbamoilfenil)-N4-[3-cloro-4-(cianometoxi)fenil]-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina

15



(c) N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinadiamina

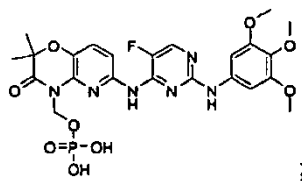
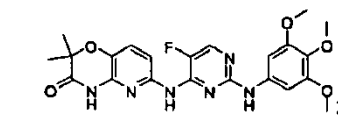
20



(d) N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina

25

(e) (N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogeno-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina)



30

o una sal, hidrato, solvato, o N-óxido de los mismos.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el cual el trastorno celular proliferativo es un neoplasma hematopoyético.

35

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el cual el neoplasma hematopoyético es un neoplasma linfoide, opcionalmente

(i) en el cual el neoplasma linfoide es un neoplasma de las células T, opcionalmente en el cual el neoplasma de las células T es leucemia T linfoblástica; o

(ii) en el cual el neoplasma linfoide es un neoplasma de las células B, opcionalmente en el cual el neoplasma de las células B es leucemia B linfoblástica o linfoma de Burkitt.

40

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el cual el trastorno celular proliferativo es un neoplasma mieloide.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el cual el neoplasma mieloide es

(i) una enfermedad mieloproliferativa, opcionalmente leucemia mielógena crónica (CML);

(ii) enfermedad mielodisplástica, opcionalmente leucemia mielomonocítica crónica;

(iii) síndrome mielodisplástico; o

(iv) leucemia mieloide aguda, asociada opcionalmente con actividad de una proteína de fusión TEL/Syk.

5 6. El compuesto de la reivindicación 2, en el cual el neoplasma hematopoyético se selecciona de leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de las células B precursoras, leucemia linfoblástica aguda de las células T, síndrome mielodisplástico, y leucemia mielógena crónica.

10 7. El compuesto de la reivindicación 1, en el cual el trastorno proliferativo es un tumor mediado viralmente, originado por modulación de la actividad de la quinasa Syk.

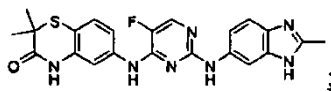
8. El compuesto de la reivindicación 7, en el cual
 (i) el tumor mediado viralmente está asociado con un virus que codifica un motivo ITAM; o
 (ii) el tumor mediado viralmente está asociado con el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, asociado opcionalmente con la actividad de la proteína K1 del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi; o
 15 (iii) el tumor mediado viralmente está asociado con un virus Epstein Barr, asociado opcionalmente con la actividad de la proteína LMP2A del virus Epstein Barr; o
 (iv) el tumor mediado viralmente está asociado con virus HTLV-1.

20 9. El compuesto de la reivindicación 1, en el cual el compuesto inhibidor de Syk comprende una mezcla de compuestos inhibidores de Syk.

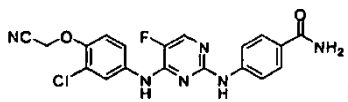
10. El compuesto de la reivindicación 1, en el cual el compuesto inhibidor de Syk se administra conjuntamente con un inhibidor de la quinasa Ab1, opcionalmente
 (i) en el cual el inhibidor de la quinasa Ab1 es 2-fenilaminopirimidina; o
 25 (ii) en el cual los inhibidores de las quinasas Syk y Ab1 se administran secuencialmente; o
 (iii) en el cual los inhibidores de las quinasas Syk y Ab1 se administran simultáneamente.

11. Un compuesto que es un compuesto inhibidor de la quinasa Syk para uso en la inhibición de metástasis de tumores, en donde el compuesto es

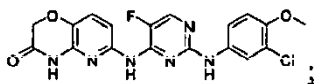
30 (a) N2-(2-metil-1-benzo[d]imidazol-6-il)-N4-(2,2-dimetil-3(4H)-oxo-2H-benzo[b][1,4]tiazin-6-il)-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina



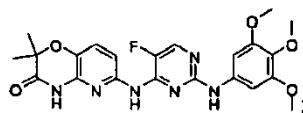
35 (b) N2-(4-carbamoilfenil)-N4-[3-cloro-4-cianometoxi-fenil]-5-fluoro-2,4-pirimidinadiamina



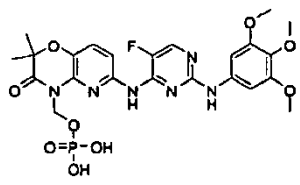
40 (c) N2-(3-cloro-4-metoxifenil)-5-fluoro-N4-(3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-2,4-pirimidinadiamina



(d) N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina



45 (e) (N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogeno-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiamina)



o una sal, hidrato, solvato, o N-óxido de los mismos.

- 5 12. El compuesto de la reivindicación 11, en el cual el tumor se selecciona de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer gastrointestinal, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, carcinoma escamoso de pulmón, y adenocarcinoma, opcionalmente en el cual el inhibidor se administra profilácticamente antes de la diagnosis de metástasis tumoral.
- 10 13. El compuesto de la reivindicación 12, en el cual la metástasis está causada por señalización de integrinas por Syk, opcionalmente en el cual la metástasis está causada por señalización de integrinas por integrinas $\beta 1$, por integrinas $\beta 2$ o por integrinas $\beta 3$.
- 15 14. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es N4-(2,2-dimetil-4-[(dihidrogeno-fosfonoxi)metil]-3-oxo-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina; o una sal, hidrato, solvato, o N-óxido de la misma.
- 20 15. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es N4-(2,2-dimetil-3-oxo-4H-5-pirido[1,4]oxazin-6-il)-5-fluoro-N2-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-pirimidinadiazina; o una sal, hidrato, solvato, o N-óxido del mismo.

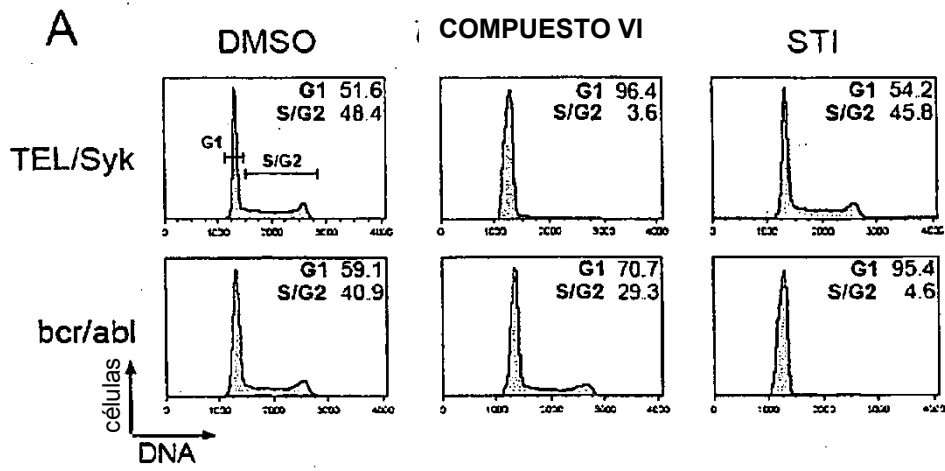


FIG. 1A

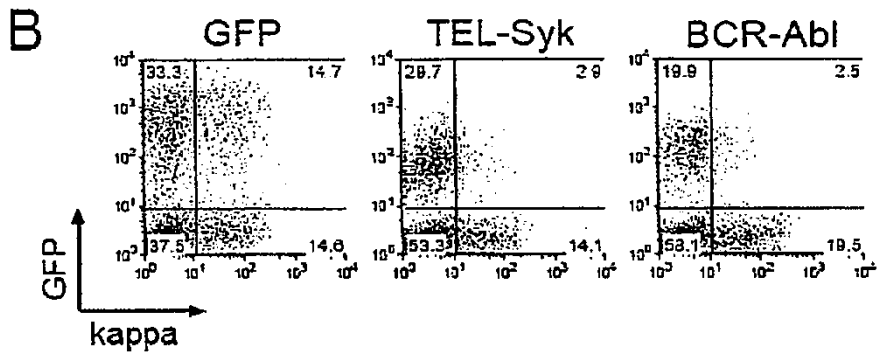


FIG. 1B

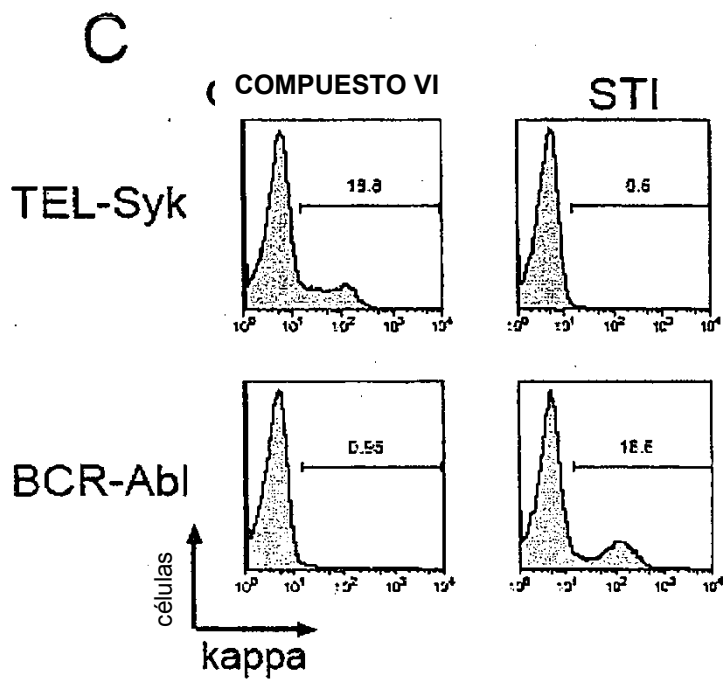


FIG. 1C

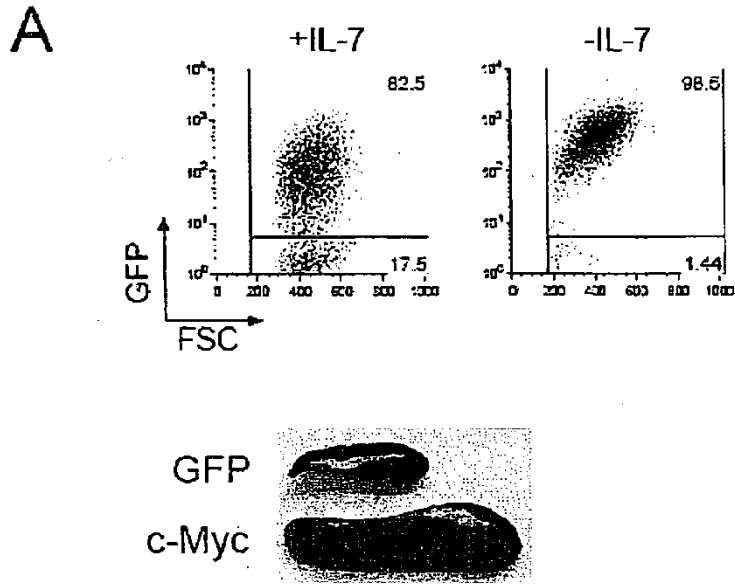


FIG. 2A

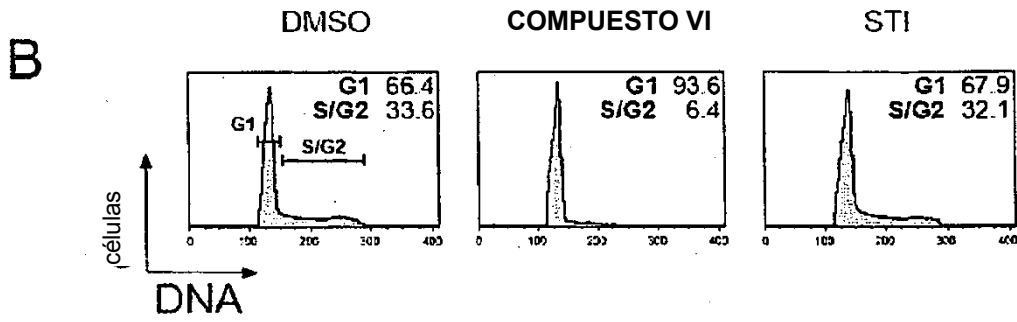


FIG. 2B

A

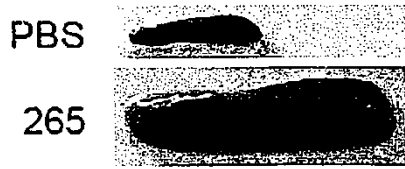


FIG. 3A

B

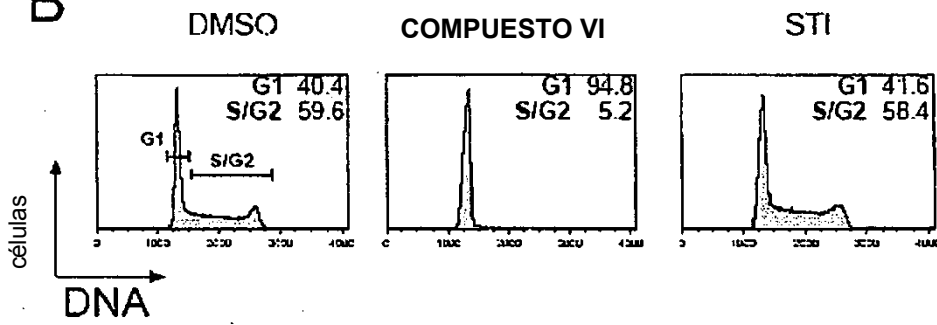


FIG. 3B

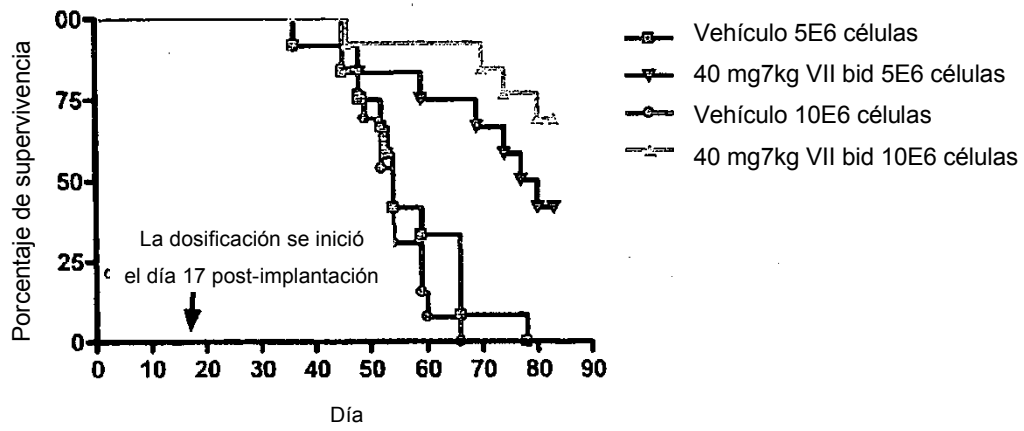


FIG. 4

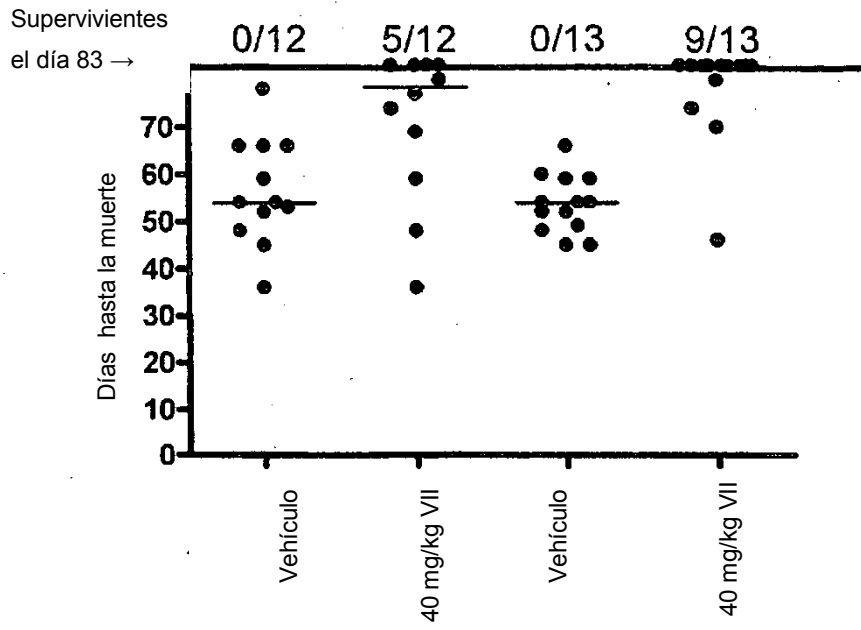


FIG. 5

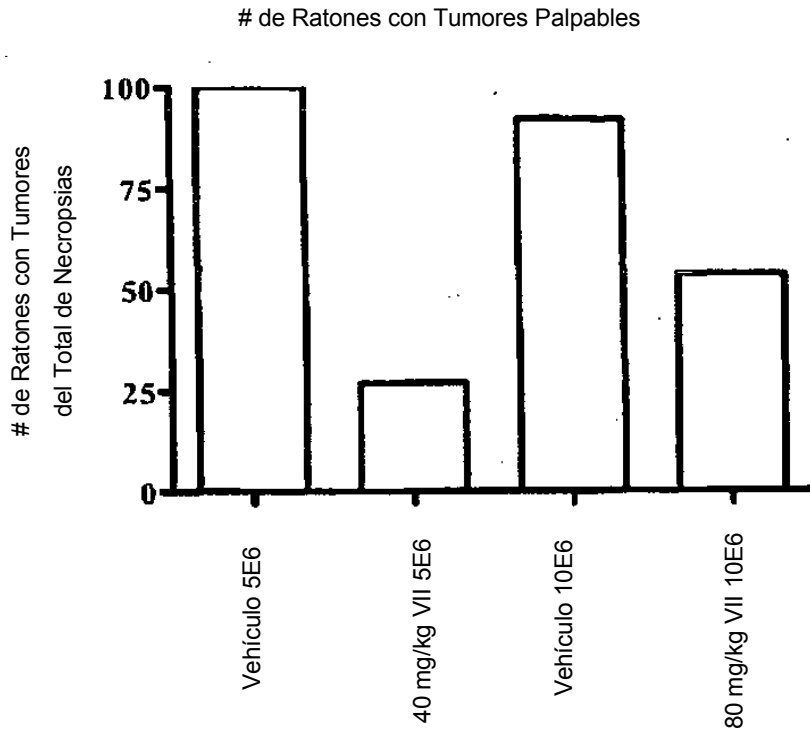


FIG. 6A

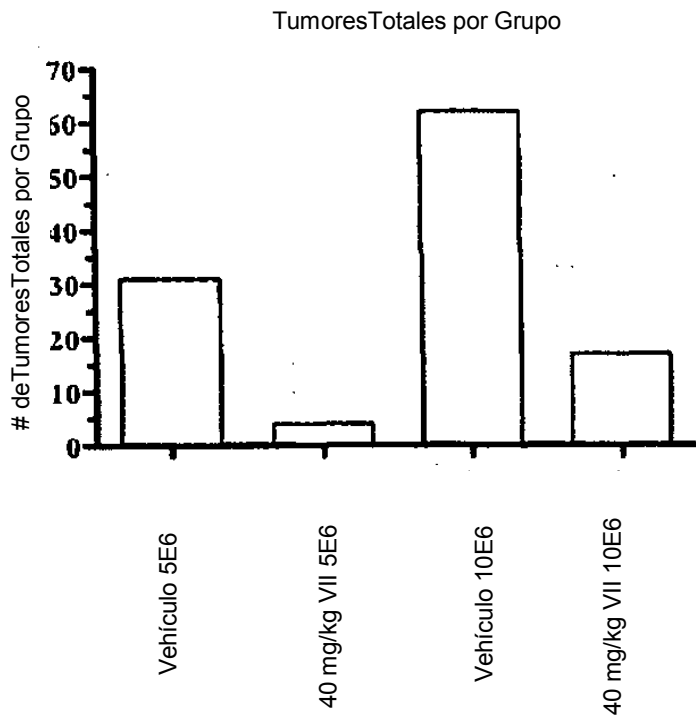


FIG. 6B

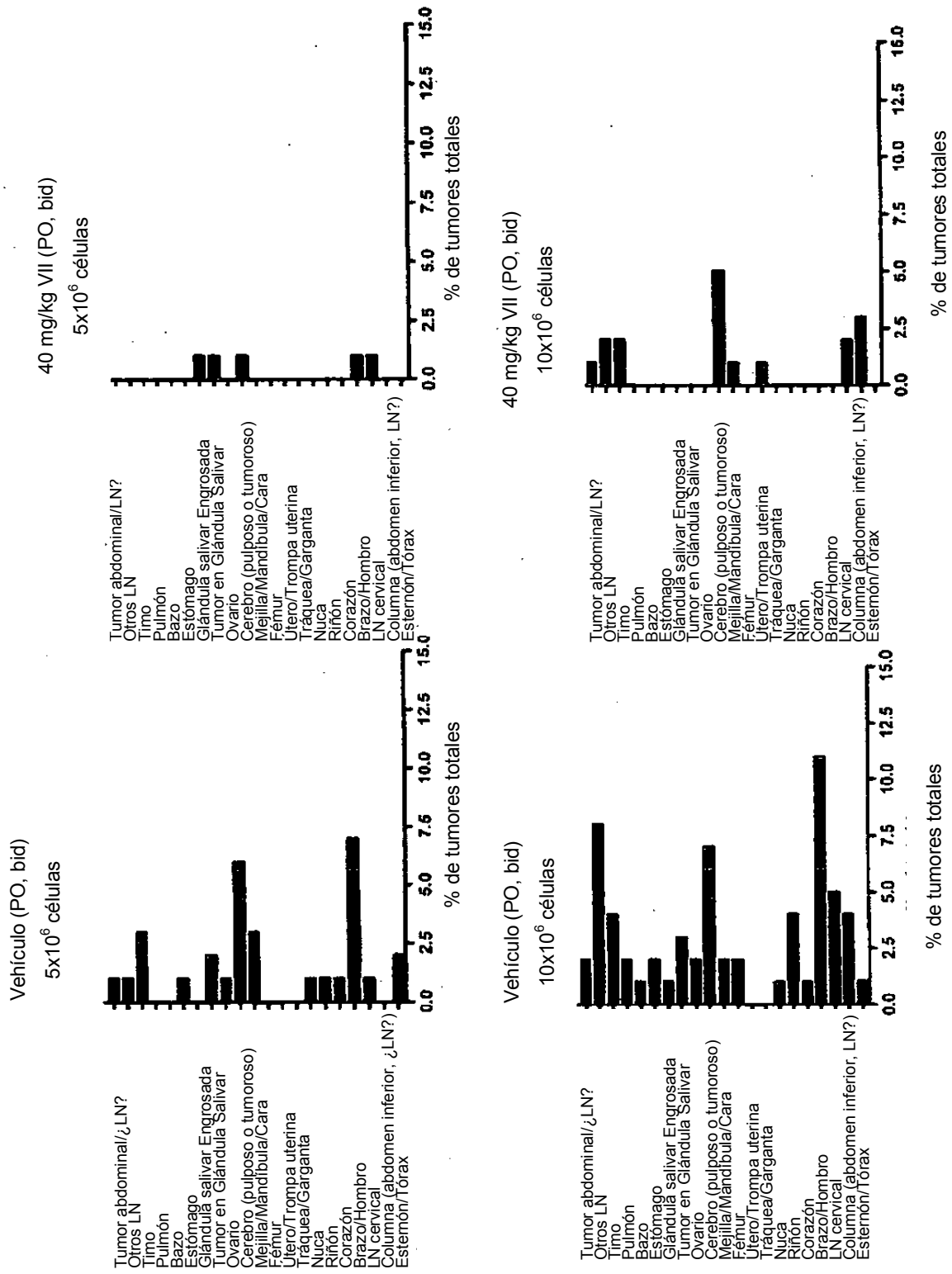


FIG. 7

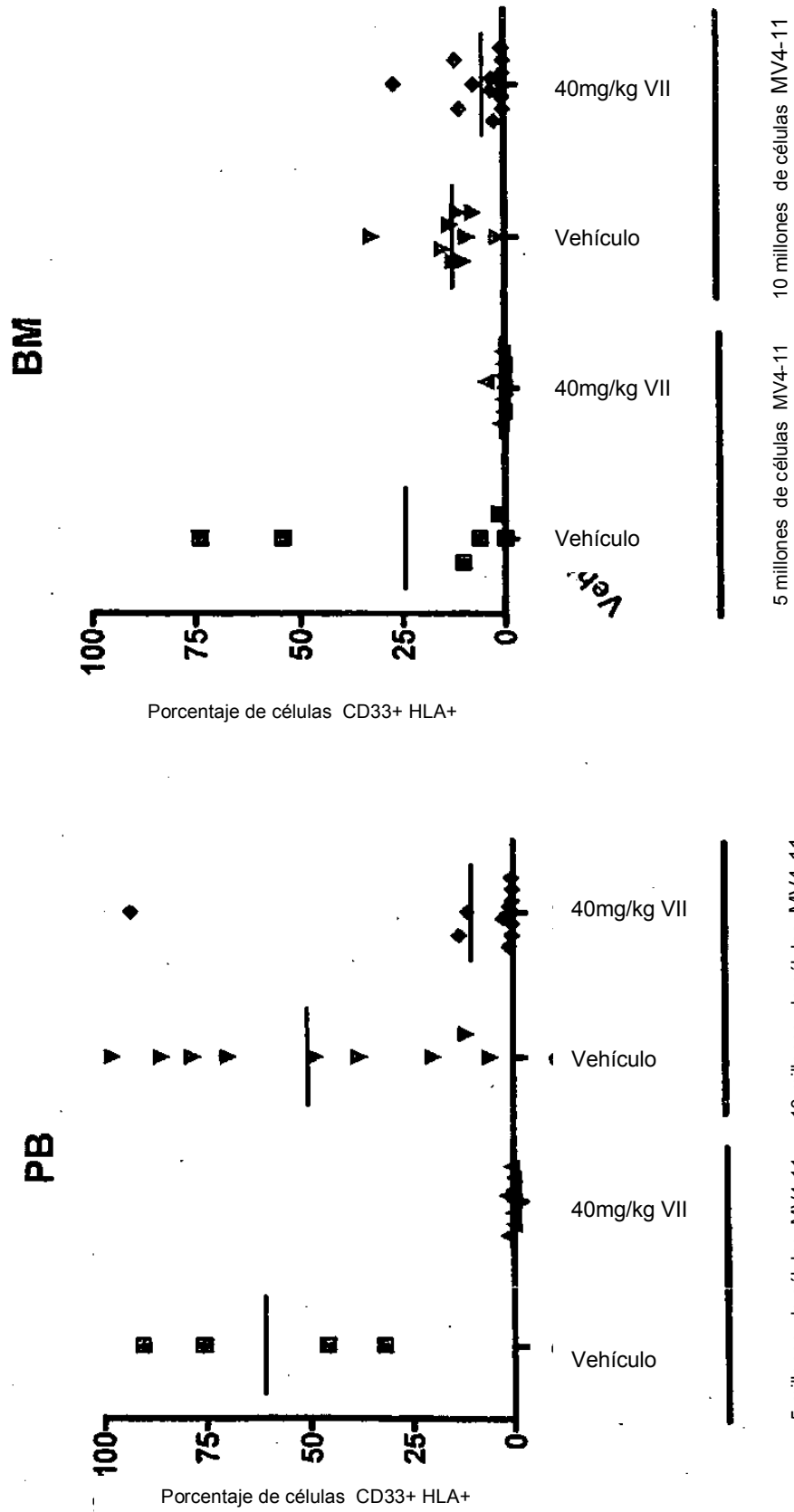


FIG. 8

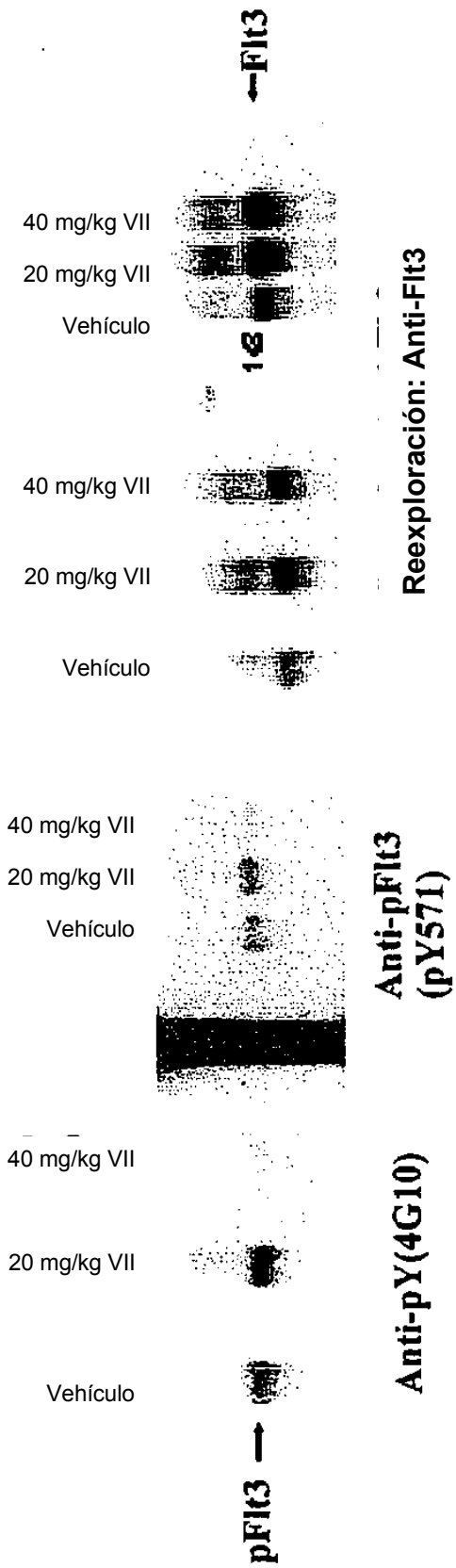


FIG. 9

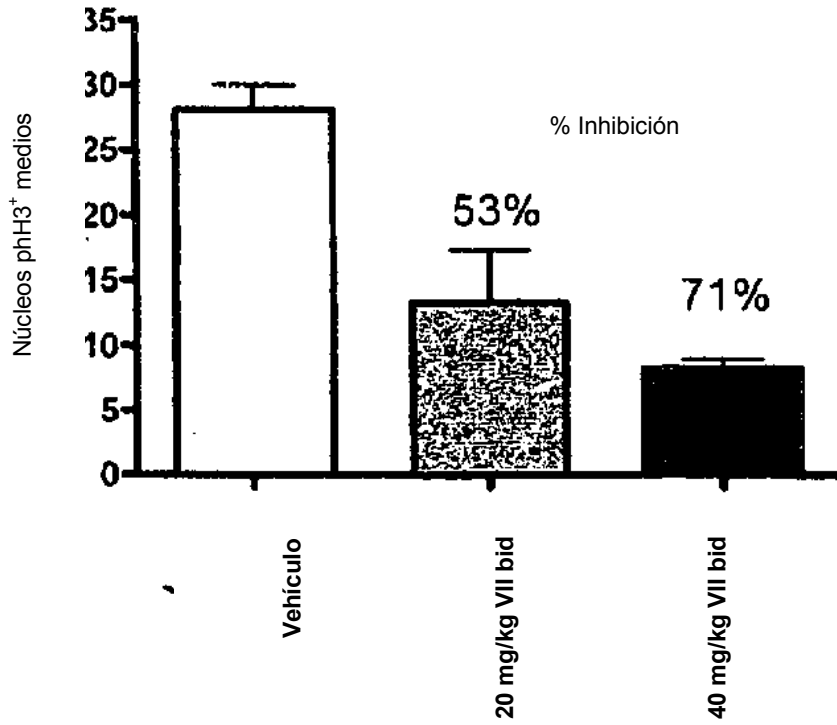


FIG. 10

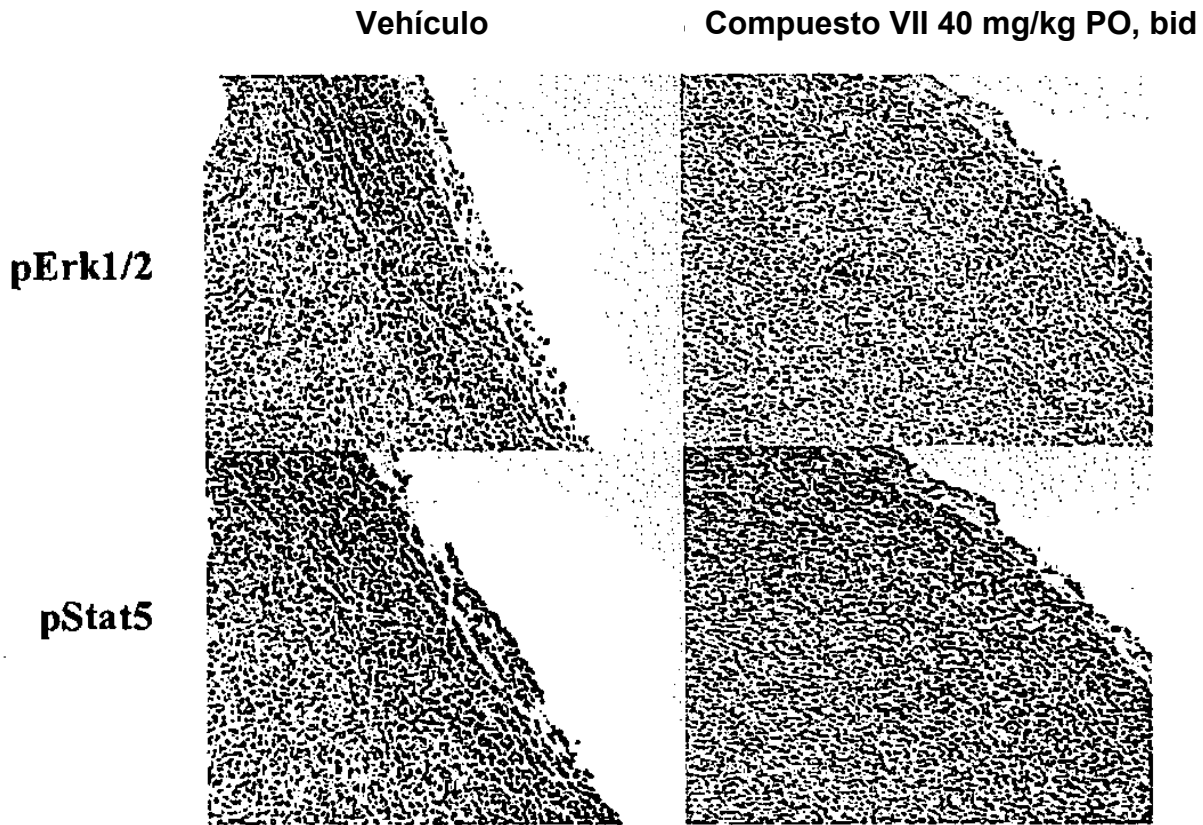


FIG. 11

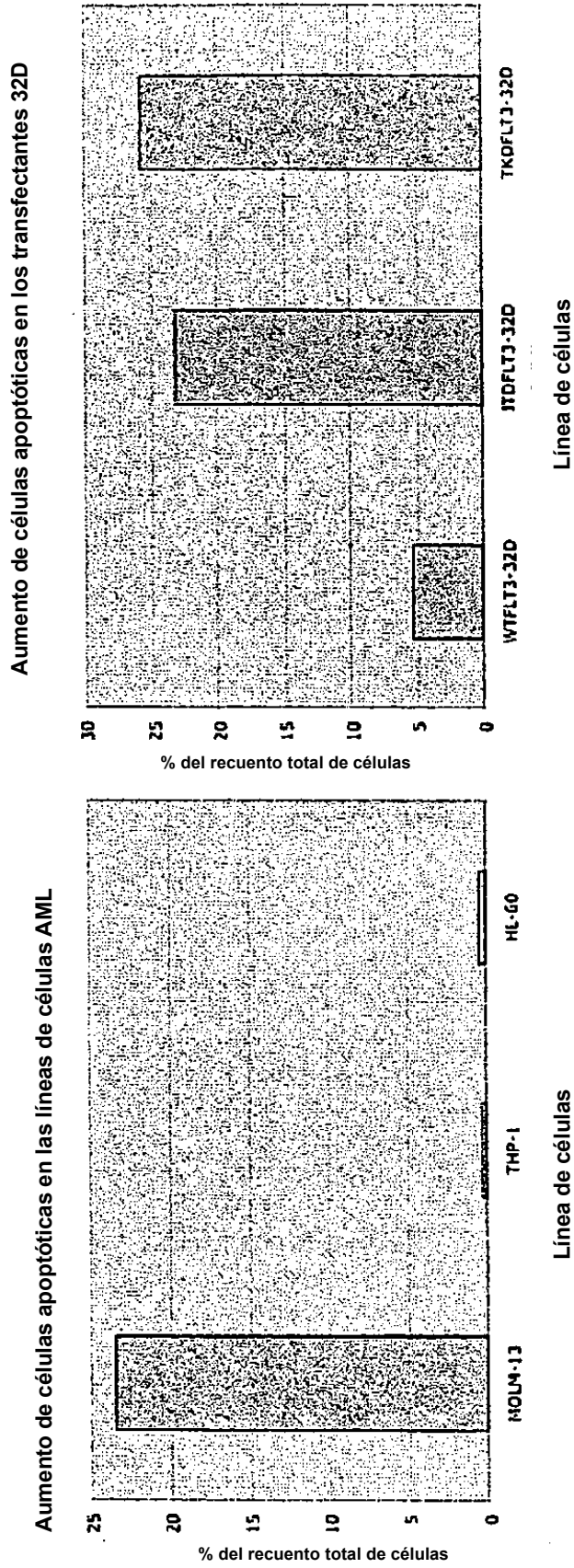


FIG. 12