



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 299**

51 Int. Cl.:

A61K 31/427 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 31/553 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07868853 .8**

96 Fecha de presentación : **27.11.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2089024**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Combinación de inhibidores de IAP e inhibidores FLT3.**

30 Prioridad: **28.11.2006 US 867448 P**
22.02.2007 US 891088 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2011

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH
Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

72 Inventor/es: **Griffin, James Douglas y**
Zawel, Leigh

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 299 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

Combinación de inhibidores de IAP e inhibidores de FLT3

5 La presente invención se refiere a combinaciones de inhibidores de IAP e inhibidores de FLT3, a composiciones farmacológicas que comprenden dicha combinación, a métodos de tratamiento de tumores malignos hematológicos, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), que comprende la combinación de un compuesto que inhibe la unión del segundo activador derivado de mitocondrias de la proteína caspasa (Smac) con el inhibidor de apoptosis (inhibidor de IAP) y uno o más agentes farmacéuticamente activos y al uso de estas combinaciones para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda; y a un envase comercial que comprende dicha combinación.

10 La presente invención también se refiere al uso de inhibidores de IAP en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos para la preparación de un medicamento para tratar tumores malignos hematológicos, incluyendo AML.

En una realización, la presente invención también se refiere al uso de inhibidores de IAP en combinación con uno o más inhibidores de FLT para la preparación de un medicamento para tratar tumores malignos hematológicos, incluyendo AML.

15 Antecedentes de la invención

FLT3, es una diana terapéutica prometedor para la leucemia y está mutada en aproximadamente 1/3 de los pacientes con AML. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a fármacos como resultado de la aparición de mutaciones puntuales en tirosina cinasas seleccionadas como diana usadas para el tratamiento de pacientes con leucemia aguda, es de creciente preocupación. Véanse Shah *et al.* (2002) y Cools *et al.* (2003). Un enfoque para anular tal resistencia es combinar estructuralmente inhibidores no relacionados y/o inhibidores de rutas de señalización diferentes.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a métodos de tratamiento de un animal de sangre caliente, especialmente de un ser humano, que tiene leucemia, en particular, AML, que es resistente a la quimioterapia convencional, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IAP; útil en el tratamiento de la AML.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de inhibidores de IAP en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos hematológicos, incluyendo AML.

30 En una realización, la presente invención también se refiere al uso de inhibidores de IAP en combinación con uno o más inhibidores de FLT para la preparación de un medicamento para tratar tumores malignos hematológicos, incluyendo AML.

Descripción detallada de los dibujos

35 La figura 1 ilustra un estudio de proliferación que muestra tratamientos de tres días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con PKC412, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) o una combinación de PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242).

40 La figura 2 ilustra un estudio de proliferación que muestra tratamientos de tres días de células G697R-Ba/F3 con PKC412, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) o una combinación de PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242).

La figura 3 ilustra un estudio de proliferación que muestra tratamientos de tres días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con PKC412, doxorubicina o una combinación de PKC412 y doxorubicina.

45 La figura 4 ilustra un estudio de proliferación que muestra tratamientos de tres días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con doxorubicina, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) o una combinación de doxorubicina y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) (n=1).

La figura 5 ilustra un estudio de proliferación que muestra tratamientos de tres días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con

Ara-c, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) o una combinación de Ara-c y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) (n=1).

5 La figura 6 ilustra la investigación *in vivo* de efectos combinados de PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242); la obtención de imágenes de bioluminiscencia refleja la carga tumoral después de 7 días tras la inyección i.v.

La figura 7 ilustra la representación gráfica de la figura 6 presentada como nivel inicial en porcentaje.

10 La figura 8 ilustra los pesos del bazo en porcentaje de ratones tratados durante 10 días con N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242), PKC412 o una combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412.

La figura 9 ilustra el tratamiento de células MOLM13-luc+ con diferentes concentraciones de PKC412 en ausencia y presencia de la línea celular estromal humana, HS-5.

15 La figura 10 ilustra inmunotransferencias que muestran la expresión de XIAP, CIAP, Bcl-2, y Bcl-XL en células FLT3-Ba/F3 mutantes frente a células Ba/F3 control. Se hibridaron las inmunotransferencias con un anticuerpo anti-beta-actina y/o un anticuerpo anti-alfa-tubulina como control de carga.

20 La figura 11 ilustra un estudio de proliferación que muestra tratamientos de tres días de células MOLM13-luc+ con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y), PKC412 o una combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y PKC412.

La figura 12 ilustra un estudio de proliferación que muestra el tratamiento de dos días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y), PKC412 o una combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y PKC412.

25 La figura 13 ilustra un estudio de proliferación que muestra el tratamiento de dos días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y), Ara-c, o una combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y Ara-c.

30 La figura 14 ilustra un estudio de proliferación que muestra el tratamiento de tres días de células MOLM13-luc+ con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y), Ara-c o una combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y Ara-c.

35 La figura 15 ilustra un estudio de proliferación que muestra el tratamiento de dos días de células FLT3-ITD-Ba/F3 con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y), doxorubicina o una combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y doxorubicina.

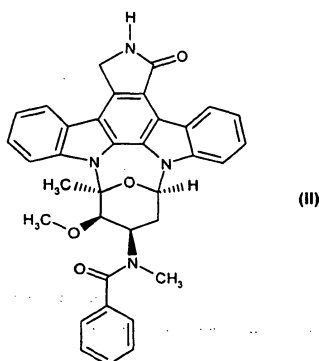
La figura 16 ilustra el crecimiento tumoral *in vivo* de células FLT3-ITD-Ba/F3 murinas en ratones.

Descripción detallada de la invención

40 La proteína cinasa C, abreviada en lo sucesivo en el presente documento PKC, es una de las enzimas clave en las rutas de transducción de señales celulares, y desempeña un papel fundamental en el control de la diferenciación y proliferación celulares. La PKC es una familia de serina/treonina cinasas.

45 Se han identificado al menos 12 isoformas de PKC, y éstas se dividen comúnmente en tres grupos basándose en sus requisitos de estructura y sustrato. Recientemente se han logrado resultados prometedores en ensayos clínicos que investigaban los efectos del inhibidor de proteína tirosina cinasa PKC412 en pacientes con AML que portan mutaciones en la proteína FLT3.

La midostaurina es N-[(9S,10R,11R,13R)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metoxi-9-metil-1-oxo-9,13-epoxi-1H,9H-diindol[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]pirrolo[3,4-j][1,7]benzodiazonin-11-il]-N-metilbenzamida de fórmula (II):



o una sal de la misma, en lo sucesivo en el presente documento "compuesto de fórmula II o midostaurina".

El compuesto de fórmula (II) o midostaurina [nombre común internacional] también se conoce como PKC412.

5 La midostaurina es un derivado del alcaloide que se produce de manera natural estaurosporina, y se ha descrito específicamente en la patente europea n.º 0 296 110 publicada el 21 de diciembre de 1988, así como en la patente estadounidense n.º 5.093.330 publicada el 3 de marzo de 1992 y en la patente japonesa n.º 2 708 047.

10 La dosificación precisa de midostaurina que ha de emplearse para tratar las enfermedades y estados mencionados anteriormente en el presente documento depende de varios factores incluyendo el huésped, la naturaleza y la gravedad del estado que está tratándose, el modo de administración. En general, se logran resultados satisfactorios cuando se administra midostaurina por vía parenteral, por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral o rectal, o por vía enteral, por ejemplo, oral, preferiblemente por vía intravenosa o, preferiblemente por vía oral. Por vía intravenosa a una dosificación diaria de 0,1-10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 1-5 mg/kg de peso corporal. En ensayos con seres humanos, una dosis total de 225 mg/día fue lo más presumiblemente la dosis máxima tolerada (MTD). Una dosificación diaria intravenosa preferida es de 0,1-10 mg/kg de peso corporal o, para la mayoría de los primates más grandes, una dosificación diaria de 200-300 mg. Una dosificación intravenosa típica es de 3-5 mg/kg, de tres a cinco veces a la semana.

20 La midostaurina se administra por vía oral en dosificaciones de hasta aproximadamente 300 mg/día, por ejemplo, 100-300 mg/día. La midostaurina se administra como una dosis única o se divide en dos o tres dosis diarias, preferiblemente en dos dosis. Una dosis particularmente importante es 200-225 mg/día. En particular, 100 mg dos veces al día (200 mg/día en total). El límite superior de dosificación es el impuesto por los efectos secundarios y puede determinarse mediante un ensayo para el paciente que está tratándose.

25 PKC412 es un inhibidor de FLT debido a que PKC412 interfiere con la función de FLT anómala evitando que las proteínas esenciales se unan al ADN. Un inhibidor de FLT bloquea la acción del gen de FLT alterado, haciendo que no tenga efecto. Otros inhibidores de FLT incluyen, pero no se limitan a compuestos N-benzoil-estaurosporina, un derivado de estaurosporina, SU11248 y MLN518.

PKC412 inhibe el crecimiento y la viabilidad de células que expresan FLT3 mutante *in vitro*, y también puede extenderse la vida de ratones que portan médula ósea transducida con FLT3 mutante. Véase Weisberg *et al.* (2002). Una posible estrategia para anular la resistencia inherente a la inhibición de FLT3 en pacientes es combinar inhibidores estructuralmente no relacionados y/o inhibidores de diferentes rutas de señalización.

30 Los mediadores de señalización apoptótica representan una diana atractiva para la intervención terapéutica. Smac media la apoptosis que se produce a través de la ruta apoptótica intrínseca [véase Du *et al.* (2000)], y se une a e inhibe la familia de IAP de proteínas. Véanse Liu *et al.* (2000) y Wu *et al.* (2000).

35 La resistencia inherente de AML a apoptosis sugiere que las IAP pueden ser buenas dianas terapéuticas en este entorno de enfermedad y, además, que la combinación de PKC412 con un inhibidor de IAP puede ser terapéuticamente beneficiosa.

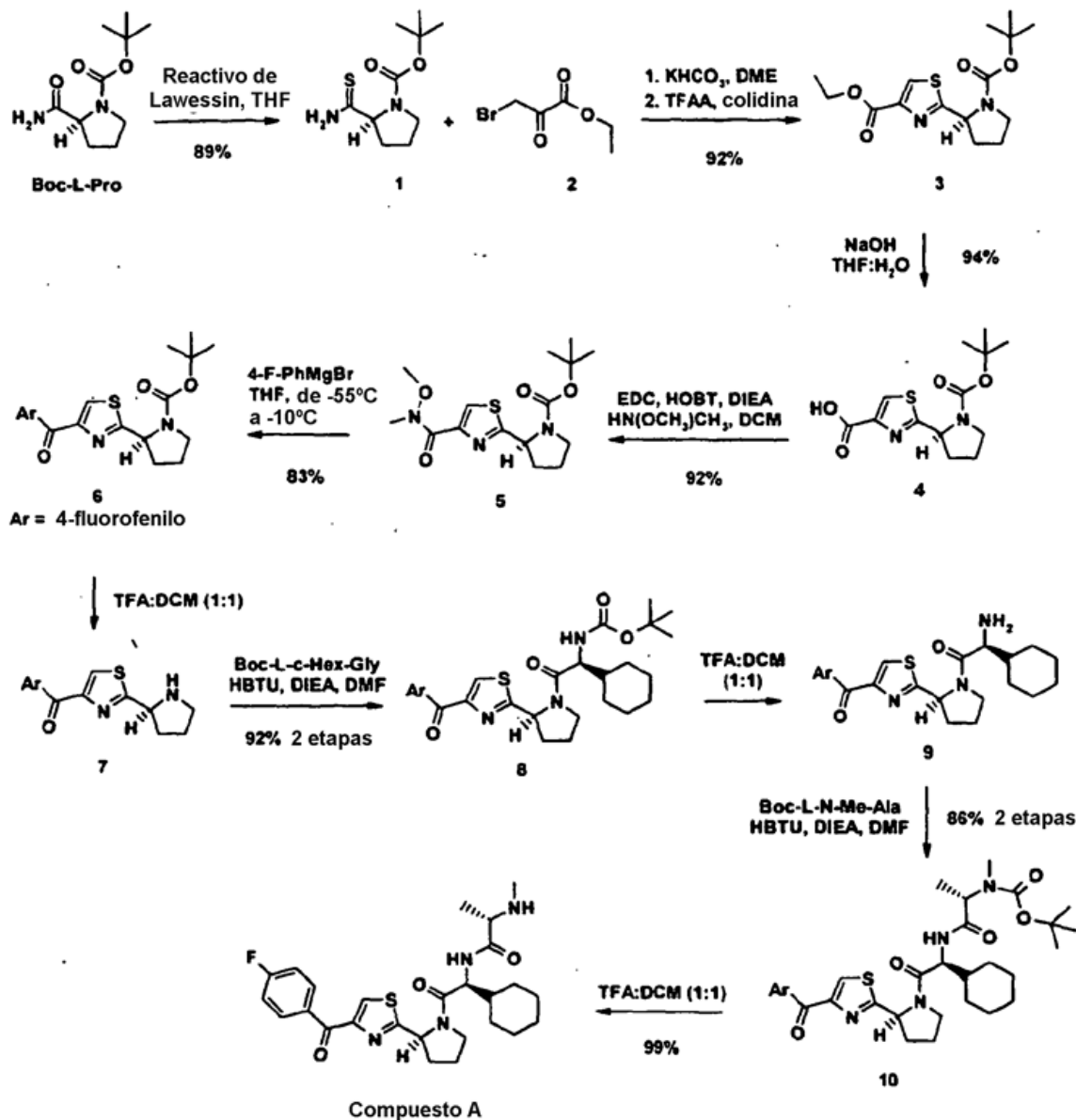
El compuesto inhibidor de IAP se selecciona del grupo que consiste en:

- (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-metilamino-propionamida; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, o

40 Un compuesto preferido es N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil)-2-metilamino-propionamida.

Un compuesto preferido es el compuesto A, (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

El compuesto A puede prepararse por ejemplo mediante el siguiente esquema de reacción:



5 Tal como se usa en el presente documento, el término "arilo" se define como un radical aromático que tiene 6-14 átomos de carbono en el anillo, y ningún heteroátomo en el anillo. El grupo arilo puede ser monocíclico o bicíclico o trícyclico condensado. Puede estar no sustituido o sustituido con uno o más, preferiblemente uno o dos, sustituyentes, en los que los sustituyentes son tal como se describen en el presente documento. Tal como se define en el presente documento, el resto de arilo puede ser completamente aromático independientemente de si es monocíclico o bicíclico. Sin embargo, si contiene más de un anillo, tal como se define en el presente documento, el término arilo incluye restos en los que al menos un anillo es completamente aromático mientras que el/los otros(s) anillo(s) puede(n) ser parcialmente insaturado(s) o saturado(s) o completamente aromático(s). El "arilo" preferido es fenilo, naftilo o indanilo. El arilo más preferido es fenilo.

15 "Het", tal como se usa en el presente documento, se refiere a heteroarilo y compuestos heterocíclicos que contienen al menos un heteroátomo S, O o N de anillo. Más específicamente, "het" es un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que contiene 1-4 heteroátomos seleccionados de N, O y S, o un sistema de anillo condensado de 8 a 12 miembros incluyendo al menos un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros que contiene 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de

N, O y S. Ejemplos de het, tal como se usa en el presente documento, incluyen pirrolidilo, tetrahidrofurilo, tetrahidrotiofurilo, piperidilo, piperazilo, purinilo, tetrahidropirano, morfolino, 1,3-diazapanilo, 1,4-diazapanilo, 1,4-oxazepanilo, 1,4-oxatiapanilo, furilo, tienilo, pirrolo, pirrolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, indazolilo, oxadiazolilo, imidazolilo, pirrolidilo, pirrolidinilo, tiazolilo, oxazolilo, piridilo, pirazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, isoxazolilo, pirazinilo, quinolilo, isoquinolilo, piridopirazinilo, pirrolopiridilo, furopiridilo, indolilo, benzofurilo, benzotiofurilo, benzoindolilo, benzotienilo, pirazolilo, piperidilo, piperazinilo, indolinilo, morfolinilo, benzoxazolilo, pirroloquinolilo sustituidos y no sustituidos y similares. Los heteroarilos están dentro del alcance de la definición de het. Ejemplos de heteroarilos son piridilo, pirimidinilo, quinolilo, tiazolilo y benzotiazolilo. Los het más preferidos son piridilo, pirimidinilo y tiazolilo. El het puede estar sustituido o no sustituido tal como se describe en el presente documento. Se prefiere que sea no sustituido o si está sustituido que esté sustituido en un átomo de carbono por halógeno, especialmente flúor o cloro, hidroxilo, alquilo C₁-C₄, tal como metilo y etilo, alcoxilo C₁-C₄, especialmente metoxilo y etoxilo, nitro, -O-C(O)-alquilo C₁-C₄ o -C(O)-O-alquilo C₁-C₄, carbamoilo, N-mono- o N,N-di(alquil inferior)carbamoilo, éster del ácido (alquil inferior)carbámico, amidino, guanidina, ureido, mercapto, sulfo, alquitio inferior, sulfoamino, sulfonamida, sulfonato, sulfanilo, SCN o nitro o en un átomo de nitrógeno por alquilo C₁-C₄, especialmente metilo o etilo, -O-C(O)-alquilo C₁-C₄ o -C(O)-O-alquilo C₁-C₄, tal como carbometoxilo o carboetoxilo. Cuando dos sustituyentes junto con un nitrógeno comúnmente unido son het, se entiende que el anillo heterocíclico resultante es un anillo que contiene nitrógeno, tal como aziridina, azetidina, azol, piperidina, piperazina, morfilina, pirrol, pirazol, tiazol, oxazol, piridina, pirimidina, isoxazol, y similares, en los que tales het pueden estar no sustituidos o sustituidos tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Halógeno es flúor, cloro, bromo o yodo, especialmente flúor y cloro.

A menos que se especifique lo contrario, "alquilo", o bien solo o bien en combinación, incluye alquilo de cadena lineal o ramificada, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo y pentilo ramificado, n-hexilo y hexilo ramificado, y similares.

Un grupo "cicloalquilo" significa cicloalquilo C₃-C₁₀ que tiene 3-10 átomos de carbono en el anillo y puede ser, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo o ciclooctilo, ciclononilo y similares. El grupo cicloalquilo puede ser monocíclico o bicíclico condensado. Se prefiere que sea monocíclico. Además, el grupo cicloalquilo preferido es ciclopentilo o ciclohexilo. Lo más preferiblemente, cicloalquilo es ciclohexilo. El grupo cicloalquilo puede estar completamente saturado o parcialmente insaturado, aunque se prefiere que esté completamente saturado. Tal como se define en el presente documento, excluye los grupos arilo. Los grupos cicloalquilo pueden estar sustituidos o no sustituidos con cualquiera de los sustituyentes definidos a continuación, preferiblemente halógeno, hidroxilo o alquilo C₁-C₆, tal como metilo. Los expertos en técnicas de química médica conocen sustituyentes que facilitan el transporte de la molécula a través de una membrana celular [véanse, por ejemplo, Gangewar S. *et al.*, Drug Discov Today, Vol. 2, págs. 148-155 (1997); y Bundgaard H. y Moss J., Pharma Res, Vol. 7, pág. 885 (1990)]. Generalmente, tales sustituyentes son sustituyentes lipófilos. Tales sustituyentes lipófilos incluyen un alquilo C₆-C₃₀ que está saturado, monoinsaturado, poliinsaturado, incluyendo polieno interrumpido con metileno, fenilo, fenilo que está sustituido por uno o dos grupos alquilo C₁-C₈, cicloalquilo C₅-C₉, cicloalquilo C₅-C₉ que está sustituido por uno o dos grupos alquilo C₁-C₈, -X₁-fenilo, -X₁-fenilo que está sustituido en el anillo de fenilo por uno o dos grupos alquilo C₁-C₈, X₁-cicloalquilo C₅-C₉ o X₁-cicloalquilo C₅-C₉ que está sustituido por uno o dos grupos alquilo C₁-C₈; en los que X₁ es alquilo C₁-C₂₄ que está saturado, monoinsaturado o poliinsaturado y una cadena lineal o ramificada. No sustituido pretende significar que el hidrógeno es el único sustituyente.

Excepto tal como se describe en el presente documento, cualquiera de arilo, het, alquilo, alqueno, alquino o cicloalquilo definidos anteriormente, pueden estar no sustituidos o sustituidos independientemente por hasta cuatro, preferiblemente uno, dos o tres sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste en: halógeno, tal como Cl o Br; hidroxilo; alquilo inferior, tal como alquilo C₁-C₃; alquilo inferior que puede estar sustituido con cualquiera de los sustituyentes definidos en el presente documento; alqueno inferior; alquino inferior; alcanoilo inferior; alcoxilo inferior, tal como metoxilo; arilo, tal como fenilo o naftilo; arilo sustituido, tal como fluorofenilo o metoxifenilo; aril-alquilo inferior, tal como bencilo, amino, mono o di-alquilo inferior, tal como dimetilamino; amino acetilamino de alcanoilo inferior; amino-alcoxilo inferior, tal como etoxiamina; nitro; ciano; alquilo inferior de ciano; carboxilo; carbalcoxilo inferior, tal como metoxicarbonilo; n-propoxicarbonilo o iso-propoxicarbonilo, arilo inferior, tal como benzoilo; carbamoilo; N-mono o N,N-di(alquil inferior)carbamoilo; éster del ácido (alquil inferior) carbámico; amidino; guanidina; ureido; mercapto; sulfo; alquitio inferior; sulfoamino; sulfonamida; benzosulfonamida; sulfonato; (alquil inferior)sulfanilo, tal como metilsulfanilo; sulfoamino; arilsulfonamida; sulfonato de arilo sustituido o no sustituido con halógeno, tal como cloro-fenil sulfonato; (alquil inferior) sulfinilo; arilosulfinilo; aril(alquil inferior)sulfinilo; (alquil inferior)arilosulfinilo; alcansulfonilo inferior; arilsulfonilo; aril(alquil inferior)sulfonilo; aril-alquil inferior, (alquil inferior)arilsulfonilo halógeno-(alquil inferior)mercapto; halógeno-(alquil inferior)sulfonilo; tal como trifluorometanoalcoxifosforilo; urea y urea sustituida de fórmula (R₉)NC(O)N(R₁₀), (R₁₃), en la que R₉, R₁₀ y R₁₃ son tal como se definió anteriormente en el presente documento, tal como urea o 3-trifluoro-metil-fenil-urea; éster del ácido alquil-carbámico o carbamatos, tales como etil-N-fenil-carbamato; o NR₈R₁₄, en la que R₈ y R₁₄ pueden iguales o diferentes y son independientemente H; alquilo inferior, por ejemplo, metilo, etilo o propilo; o R₈ y R₁₄, junto con el átomo de N, forman un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que contiene un heteroátomo de nitrógeno y

opcionalmente uno o dos heteroátomos adicionales seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre (por ejemplo piperazinilo, pirazinilo, (alquil inferior)piperazinilo, piridilo, indolilo, tiofenilo, tiazolilo, benzotiofenilo, pirrolidinilo, piperidino o imidazolinilo) en el que el anillo heterocíclico puede estar sustituido con cualquiera de los sustituyentes definidos anteriormente en el presente documento. Preferiblemente, los grupos alquilo, cicloalquilo y arilo mencionados anteriormente están independientemente no sustituidos o están sustituidos por alquilo inferior, arilo, aril-alquilo inferior, carboxilo, carbalcoxilo inferior y especialmente halógeno, -OH, -SH, -OCH₃, -SCH₃, -CN, -SCN o nitro.

Tal como se define en el presente documento, la expresión “alquilo inferior”, cuando usada sola o en combinación, se refiere a alquilo que contiene 1-6 átomos de carbono. El grupo alquilo puede ser de cadena lineal o ramificada, y es tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

La expresión “alquenilo inferior” se refiere a un grupo alquenilo que contiene 2-6 átomos de carbono. Un grupo alquenilo es un grupo hidrocarbilo que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Tal como se define en el presente documento, puede estar no sustituido o sustituido con los sustituyentes descritos en el presente documento. Los dobles enlaces carbono-carbono pueden estar entre cualquiera de dos átomos de carbono del grupo alquenilo. Se prefiere que contenga 1 ó 2 dobles enlaces carbono-carbono y más preferiblemente un doble enlace carbono-carbono. El grupo alquenilo puede ser de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos incluyen etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 2-metil-1-propenilo, 1,3-butadienilo y similares. El grupo alquenilo preferido es etenilo.

La expresión “alquinilo inferior”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquinilo que contiene 2-6 átomos de carbono. Un grupo alquinilo es un grupo hidrocarbilo que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. El triple enlace carbono-carbono puede estar entre cualquiera de dos átomos de carbono del grupo alquinilo. Se prefiere que el grupo alquinilo contenga 1 ó 2 triples enlaces carbono-carbono y más preferiblemente un triple enlace carbono-carbono. El grupo alquinilo puede ser de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos incluyen etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo y similares. El grupo alquinilo preferido es etinilo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “arilalquilo” se refiere a un grupo arilo conectado a la cadena principal mediante un grupo alquileo de puente. Los ejemplos incluyen bencilo, fenetilo, naftilmetilo y similares.

El arilalquilo preferido es bencilo. De manera similar, grupo cianoalquilo se refiere a un grupo ciano conectado a la cadena principal mediante un grupo alquileo de puente.

La expresión “alquilarilo”, por otro lado, se refiere a un grupo alquilo que se une a la cadena principal a través de un grupo fenileno. Los ejemplos incluyen metilfenilo, etilfenilo y similares.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “alcanoílo inferior” se refiere a una cadena de alquilo inferior en la que uno de los átomos de carbono se sustituye por un grupo C=O. El grupo C=O puede estar presente en uno de los extremos del sustituyente o en la mitad del resto. Los ejemplos incluyen formilo, acetilo, 2-propanoílo, 1-propanoílo y similares.

El término “alcoxilo” se refiere a un grupo alquilo tal como se define en el presente documento, conectado a la cadena principal mediante un átomo de oxígeno. Los ejemplos incluyen metoxilo, etoxilo y similares.

La expresión “tioalquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo, tal como se define en el presente documento, conectado a la cadena principal mediante un átomo de azufre. Los ejemplos incluyen tiometilo (o mercaptometilo), tioetilo (mercaptoetilo) y similares.

La expresión “carbalcoxilo inferior” o sinónimo del mismo se refiere a un grupo alcoxycarbonilo, en el que la unión a la cadena principal es a través del grupo arilo (C(O)). Los ejemplos incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo y similares.

Debe entenderse que la terminología C(O) se refiere a un grupo -C=O, ya sea cetona, aldehído o ácido o derivado de ácido. De manera similar, S(O) se refiere a un grupo -S=O.

Tal como se usa en el presente documento, el término S(O)_r se refiere al número de átomo de oxígenos unidos al átomo de azufre. Cuando r = 2, entonces S(O)_r = SO₂; cuando r es 1, entonces S(O)_r es SO; y cuando r = 0, entonces S(O)_r es S.

El término “C₀”, tal como se usa en el presente documento, como parte de una definición de alquilo como, por ejemplo, C₀₋₁₀, se refiere a cero átomos de carbono. Por tanto, “arilalquilo C₀-C₁₀” significa que el grupo arilo se une

directamente a la cadena principal (C₀) o que existe un grupo alquileo C₁-C₁₀ que une la cadena principal a un grupo arilo.

El término "(CH₂)₀₋₆" como parte de definición de un grupo mayor, por ejemplo, cicloalquilo (CH₂)₀₋₆ C₃-C₇, se refiere a un grupo que no está presente (CH₂)₀, o a un grupo que contiene 1-6 átomos de carbono (CH₂)₁₋₆.

- 5 La expresión "(CH₂)₀₋₆-(CH)₀₋₁,(arilo)₁₋₂", en la definición de R₁₁ y R₁₂, pretende significar uno de los siguientes (CH₂)₁₋₆-arilo, arilo, -CH(arilo)₂ o (CH₂)₁₋₆ (CH)(arilo)₂.

Tal como se usa en el presente documento, la variable "n" se refiere al número de sustituyentes en el anillo de pirrolidinilo (tetrahidropirrolilo). El término "n" se define como 0-7 y determina el número de sustituyentes Q en el anillo de pirrolidinilo (tetrahidro-pirrolilo). Q sólo puede estar presente en las posiciones 2, 3, 4 ó 5 del anillo de pirrolidinilo, es decir, en los átomos de carbono del anillo de pirrolidinilo. Excepto para el número de carbono 2 que puede permitir una substitución, cada uno de los otros átomos de carbono están saturados y cada uno de ellos pueden tener dos sustituyentes sobre los mismos. Cuando n es 7, entonces cada uno de los átomos de carbono están unidos con Q tal como se define en el presente documento. Cada Q puede ser igual o diferente. Sin embargo, cuando n es 6, entonces uno de los siete posibles sustituyentes es H, y los otros cinco son Q, que pueden ser iguales o diferentes. Además, cuando n es 5, entonces dos de los posibles sustituyentes son H, y los otros cinco son independientemente Q, tal como se define en el presente documento. Cuando n es 4, entonces tres de los siete posibles sustituyentes son H, y el resto son Q independientemente tal como se define en el presente documento. Cuando n es 3, entonces cuatro de los siete posibles sustituyentes son H, y los otros tres son Q tal como se define en el presente documento. Cuando n es 2, entonces dos de los siete posibles sustituyentes son Q, y el resto son H. Cuando n es 1, entonces sólo uno de los siete posibles sustituyentes es Q, y el resto son H. Finalmente, cuando n es 0, todos los siete de los sustituyentes son H.

Debe entenderse que cada uno de los sustituyentes Q puede ser igual o puede ser diferente.

Cuando se usa la forma plural para los compuestos, sales, preparaciones farmacéuticas, pretende significar también un compuesto individual, preparación farmacéutica individual, sal y similares.

- 25 Asimismo están comprendidos las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, los correspondientes racematos, diastereoisómeros, enantiómeros, tautómeros, así como las correspondientes modificaciones cristalinas de los compuestos dados a conocer anteriormente cuando están presentes, por ejemplo, solvatos, hidratos y polimorfos, que se dan a conocer en el mismo.

La dosificación precisa de un compuesto inhibidor de IAP que va a emplearse depende de varios factores incluyendo el huésped, la naturaleza y la gravedad del estado que está tratándose, el modo de administración. El compuesto inhibidor de IAP puede administrarse mediante cualquier vía incluyendo por vía oral, por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intratumoral, o por vía rectal, o por vía enteral. Preferiblemente, el compuesto inhibidor de IAP se administra por vía oral, preferiblemente a una dosificación diaria de 1-300 mg/kg de peso corporal o, para los primates más grandes, una dosificación diaria de 50-5.000, preferiblemente 500-3.000 mg. Una dosificación diaria oral preferida es 1-75 mg/kg de peso corporal o, para los primates más grandes, una dosificación diaria de 10-2.000 mg, administrada como una dosis única o dividida en múltiples dosis, tal como dosificación dos veces al día.

Habitualmente, se administra una dosis pequeña inicialmente y se aumenta la dosificación gradualmente hasta que se determina la dosificación óptima para el huésped en tratamiento. El límite superior de la dosificación es el impuesto por los efectos secundarios y puede determinarse mediante ensayo para el huésped que está tratándose.

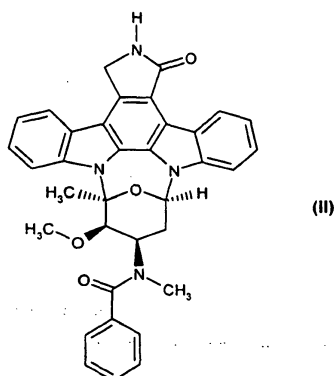
Los regímenes de dosificación deben evaluarse para la indicación particular, la edad, el peso y el estado físico general del paciente, y la respuesta deseada pero generalmente las dosis serán de desde aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día según se necesite en administración única o múltiple diaria.

En un aspecto, la presente invención proporciona una combinación que comprende

- 45 a) Compuesto I: N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil)-2-metilaminopropionamida o compuesto Ia: (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2oxo-etil)-2-metilamino-propionamida

en combinación con uno o más de los siguientes:

(b) un compuesto de fórmula (II):



o una sal del mismo;

(c) doxorubicina; y

(d) citarabina.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona una combinación que comprende compuesto (I) y compuesto (II), doxorubicina o citarabina. El compuesto (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una combinación que comprende compuesto (Ia) y compuesto (II), doxorubicina o citarabina. El compuesto (Ia) puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende compuesto (I) o (Ia) y compuesto (II), doxorubicina o citarabina. El compuesto (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida y el compuesto (Ia) puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

- 15 En otro aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende compuesto (I) o (Ia) en combinación con una composición farmacéutica que comprende compuesto (II), doxorubicina o citarabina. El compuesto (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida y el compuesto (Ia) puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

- 20 Los inhibidores de IAP proapoptótico, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, potencian la destrucción de líneas celulares resistentes y sensibles a PKC412 que expresan FLT3 mutante cuando se combinan con o bien PKC412 o bien agentes citotóxicos convencionales (doxorubicina y Ara-c) *in vitro* e *in vivo*.

- 25 Además, la combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida y PKC412 anula la señalización de viabilidad mediada por el estroma que confiere resistencia a PKC412.

- 30 N-[1-Ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida también potencia los efectos antiproliferativos de agentes quimioterápicos convencionales, tales como un inhibidor de la topoisomerasa, incluyendo doxorubicina, y un antimetabolito, incluyendo citarabina, también conocida como Ara-c.

- 35 N-[1-Ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilaminopropionamida potencian los efectos antiproliferativos de doxorubicina o Ara-c *in vitro* en células resistentes y sensibles a PKC412.

La expresión "un inhibidor de la topoisomerasa" incluye un inhibidor de la topoisomerasa I y un inhibidor de la topoisomerasa II. Los ejemplos de un inhibidor de la topoisomerasa I incluyen, pero no se limitan a, topotecán, gimatecán, irinotecán, camptotecina y sus análogos, 9-nitrocamptotecina y el conjugado de camptotecina macromolecular PNU-166148; sal de acetato de 10-hidroxycamptotecina; etopósido; clorhidrato de idarubicina;

clorhidrato de irinotecán; tenipósido; clorhidrato de topotecán; doxorubicina; clorhidrato de epirubicina; clorhidrato de mitoxantrona; y clorhidrato de daunorubicina. El irinotecán puede administrarse, por ejemplo, en la forma tal como se comercializa, por ejemplo, con el nombre comercial CAMPTOSAR. El topotecán puede administrarse, por ejemplo, en la forma tal como se comercializa, por ejemplo, con el nombre comercial HYCAMTIN. La expresión "inhibidor de la topoisomerasa II", tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, las antraciclinas, tales como doxorubicina, incluyendo formulación liposomal, por ejemplo, CAELYX, daunorubicina, incluyendo formulación liposomal, por ejemplo, DAUNOSOME, epirubicina, idarubicina y nemorubicina; las antraquinonas mitoxantrona y losoxantrona; y las podofilotoxinas etopósido y tenipósido. El etopósido se comercializa como ETOPOPHOS; el tenipósido como VM 26-BRISTOL; la doxorubicina como ADRIBLASTIN o ADRIAMYCIN; la epirubicina como FARMORUBICIN; la idarubicina como ZAVEDOS; y la mitoxantrona como NOVANTRON.

La expresión "un anti-metabolito", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe o altera la síntesis de ADN dando como resultando muerte celular. Los ejemplos de un antimetabolito incluyen, pero no se limitan a, 6-mercaptopurina; citarabina; fludarabina; flexuridina; fluorouracilo; capecitabina; raltitrexed; metotrexato; cladribina; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; tioguanina; hidroxiurea; agentes desmetilantes del ADN tales como 5-azacitidina y decitabina; edatrexato; y antagonistas de ácido fólico, tales como, pero sin limitarse a, pemetrexed. La capecitabina puede administrarse, por ejemplo, en la forma tal como se comercializa, por ejemplo, con el nombre comercial XELODA; y la gemcitabina como GEMZAR. La citarabina es una forma acortada de arabinósido de citosina, un agente quimioterápico comúnmente usado principalmente en el tratamiento de leucemia y linfoma de no Hodgkin. También se conoce como Ara-C, Cytosar®-U, Tarabine® PFS u otros nombres comerciales locales.

Los términos "tratamiento" o "terapia" se refieren al tratamiento profiláctico o preferiblemente terapéutico incluyendo, pero sin limitarse a, paliativo, curativo, de alivio de síntomas, de reducción de síntomas, regulatorio y/o inhibitorio, de dichas enfermedades, especialmente de las enfermedades mencionadas a continuación.

El término "AML", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento no controlado que progresa rápidamente de células mieloides, por ejemplo granulocitos, así como células eritroides y megacariocíticas y sus progenitores. En los pacientes con AML, las células mieloides, eritroides o megacariocíticas inmaduras superan enormemente en número a los eritrocitos (glóbulos rojos) lo que conduce a fatiga y hemorragia, y también a aumento de la sensibilidad a infección. En niños, así como en adultos, la AML tiene un mal pronóstico pese al uso de protocolos quimioterápicos agresivos. Las tasas de supervivencia global son del 40-60%. El trasplante de médula ósea autólogo precedido por quimioterapia mieloablative no cambia la supervivencia, pero un trasplante de médula ósea alogénico precedido por quimioterapia agresiva podría aumentar las tasas de supervivencia en hasta el 70%. Desgraciadamente, la disponibilidad de un donante hermano compatible es limitada. Por tanto, son necesarias nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la AML.

Un animal de sangre caliente (o paciente) es preferiblemente un mamífero, especialmente un ser humano o un ser humano joven.

N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilaminopropionamida potencian sinérgicamente los efectos antiproliferativos de PKC412 frente a células que expresan FLT3 mutante. En experimentos de combinación que implican N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-2-metilamino-propionamida y PKC412, se observan efectos sinérgicos aditivos entre los dos compuestos en combinación frente a una variedad de líneas celulares sensibles y resistentes a PKC412 *in vitro*. Se observa un efecto cooperativo positivo en un modelo de obtención de imágenes *in vivo* de leucemia aguda cuando se tratan ratones con una combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenil-octahidro-pirrol-2,3-c)piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilaminopropionamida y PKC412; se observa que la carga tumoral es la menor en ratones atímicos NCr a los que se inyectan i.v. células que expresan FLT3-ITD-Ba/F3-luc+ y se tratan con la combinación de agentes, en comparación con vehículo o cada agente solo.

Pueden persistir números pequeños de células leucémicas CD34+ en el microentorno de la médula ósea en pacientes con CML tras años de terapia con imatinib. De manera similar, estudios clínicos de pacientes con AML avanzada que reciben inhibidores de FLT3 cinasa revelan que un patrón de respuesta común era una disminución espectacular en la población circulante de blastocitos, con una disminución mínima o retrasada en los blastocitos de la médula, lo que sugiere un entorno de protección. Estas observaciones sugieren que es esencial una mayor compresión de la interacción de las células estromales con células leucémicas. La quimiorresistencia mediada por estroma de células mutantes que expresan FLT3 a PKC412 puede superarse mediante el tratamiento de las células con un inhibidor de IAP, lo que demuestra un posible papel de IAP en la señalización mediada por factores de crecimiento que conduce a resistencia a PKC412.

Se estudia la regulación por FLT3 de un panel de proteínas de señalización de la apoptosis, incluyendo Bcl-2, Bcl-

5 XL, y los sustratos de IAP fuertes de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, XIAP y CIAP1. Sólo se observan cambios moderados en XIAP, Bcl-2 y Bcl-XL en células transformadas con FLT3, en comparación con las células parentales. Estos pequeños cambios en la expresión de proteínas pueden tener cierta importancia en la sensibilidad de las células transformadas con FLT3 a los efectos citotóxicos de un inhibidor de proteínas tirosina cinasas, tales como PKC412, o un inhibidor de IAP, tal como N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida, así como a los efectos citotóxicos potenciados de los dos agentes combinados.

10 En conclusión, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida son eficaces frente a FLT3 mutante a dosis que pueden lograrse fisiológicamente y tolerarse bien *in vivo*. N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida también potencia los efectos
15 inhibidores de PKC412, así como de los agentes quimioterápicos convencionales, tales como doxorubicina y Ara-c, actuando de una forma aditiva-sinérgica frente a células que expresan FLT3 mutante *in vitro*. La disponibilidad de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilaminopropionamida y PKC412 (o doxorubicina o Ara-c) para combinarse de manera aditiva o sinérgica en células que expresan FLT3 mutante
20 resistentes a PKC412 sugiere que los inhibidores de IAP como N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida podrían usarse potencialmente conjuntamente con otros agentes para lograr un grado mayor de capacidad de respuesta de los pacientes eliminando la aparición de mutaciones de FLT3 a fármacos.

25 Por tanto, en otro aspecto la presente invención proporciona un método de tratamiento de un animal de sangre caliente que tiene leucemia mieloide aguda (AML) o leucemia mieloide aguda (AML) que es resistente a la quimioterapia convencional que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de compuesto (I) o (Ia) y compuesto (II), doxorubicina o citarabina. El compuesto (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida y el compuesto (Ia)
30 puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una combinación o una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I) o (Ia) y el compuesto (II), doxorubicina o citarabina para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) o la leucemia mieloide aguda que es resistente a la quimioterapia convencional. El compuesto
35 (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida y el compuesto (Ia) puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una combinación o una composición farmacéutica que comprende el compuesto (I) o (Ia) y el compuesto (II), doxorubicina o citarabina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) o la leucemia mieloide aguda que es
40 resistente a quimioterapia convencional. El compuesto (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida y el compuesto (Ia) puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

En otro aspecto, se proporciona un envase comercial que comprende la combinación o la composición farmacéutica que comprende el compuesto (I) o (Ia) y el compuesto (II), doxorubicina o citarabina junto con instrucciones para el uso simultáneo, separado o secuencial de los mismos en el tratamiento de AML. El compuesto (I) puede ser N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida y el compuesto (Ia)
45 puede ser (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida.

50 Para los siguientes ejemplos, PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida o (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida se sintetizan por Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza, y se disuelven en DMSO para obtener disoluciones madre 10 mM. Luego se realizan diluciones en serie, también en DMSO, para obtener las diluciones finales para los ensayos celulares.

55 **Ejemplo 1: Preparación de líneas celulares y cultivos celulares**

Se realizó transducción de la línea celular hematopoyética murina dependiente de IL-3, Ba/F3, con retrovirus MSCV que contenían o bien FLT3-ITD o bien FLT3-D835Y que portaban un marcador seleccionable de neomicina, y se

seleccionaron según su resistencia a neomicina. Véase Kelly *et al.* (2002). Se seleccionaron las células transducidas con FLT3-ITD para hacerlas crecer en G418 (1 mg/ml). Las líneas celulares de Ba/F3 resistentes a PKC412, que expresaban FLT3-ITD que portaban una mutación en el sitio de unión a ATP (F691 L, A627T, G697R, N676D), se desarrollaron tal como se describió anteriormente. Véase Cools *et al.* (2004). El Dr. Scott Armstrong, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA facilitó la línea celular que expresaba FLT3-ITD derivada de AML humana, MV4;11 [véase Quentmeier *et al.* (2003)]. El Dr. Andrew Kung, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA modificó la línea celular que expresaba FLT3-ITD derivada de AML humana, MOLM-13, para que expresara luciferasa y la facilitó como MOLM13-luc+. Todas las líneas celulares se pusieron en cultivo con un 5% de CO₂ a 37°C, a una concentración de 2 x 10⁵ a 5 x 10⁵ en RPMI (Mediatech, Inc., Herndon, VA) con un 10% de suero bovino fetal y aporte complementario de un 1% de glutamina. Las células Ba/F3 parenterales que expresaban FLTE de tipo natural se pusieron en cultivo de manera similar con un 15% de medio condicionado WEHI como fuente de IL-3. todas las líneas celulares transfectadas se pusieron en cultivo en medios complementados con 1 mg/ml de G418.

Ejemplo 2: Anticuerpos e inmunotransferencia

El anticuerpo XIAP (clon 28?) (BD Sciences, Franklin Lakes, NJ), el anticuerpo CIAP1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), el anticuerpo Bcl-2 (c-2) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y el anticuerpo Bcl-XL (H-5) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), se usaron cada uno a una dilución de 1:200. El anticuerpo monoclonal anti-β-actina (clon AC-15) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), y se usó a una dilución de 1:2000. El anticuerpo anti-α-tubulina (clon DM1A) se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) y se usó a una dilución de 1:2000. Se llevaron a cabo la preparación de lisis de proteínas e inmunotransferencia tal como se describió anteriormente. Véase Weisberg *et al.* (2002).

Ejemplo 3: Análisis de apoptosis y viabilidad celular

El ensayo de exclusión con azul trípano se ha descrito anteriormente [véase Weisberg *et al.* (2002)], y se usó para determinar la proliferación de células en cultivo en presencia y ausencia de PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242). La viabilidad celular se notifica como porcentaje de células control (no tratadas). Las barras de error representan el error estándar de la media para cada punto de datos. Se midió la apoptosis de las células tratadas con fármaco usando el kit Annexin-V-Fluos Staining (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), tal como se ha descrito anteriormente. Véase Weisberg *et al.* (2002).

Ejemplo 4: Experimentos en estroma humano

Se sembraron células estromales humanas HS-5 (10.000/pocillo) durante 24 horas antes de sembrar células MOLM13-luc+ (40.000/pocillo), seguido por tratamiento con un intervalo de concentraciones de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidropirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, solos y combinados. Entonces se analizaron las células para determinar la expresión de luciferasa usando un dispositivo generador de imágenes Xenogen.

Ejemplo 5: Estudios de combinación de fármacos

Para los estudios de combinación de fármacos, se añadieron PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidropirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) simultáneamente a razones fijas a células FLT3-ITD-Ba/F3 y células que expresan FLT3 mutante resistentes a PKC412. La viabilidad celular se determina usando el ensayo de exclusión con azul trípano, y se expresa como la función de células tratadas con fármaco con crecimiento afectado (FA) frente a células control; los datos se analizan mediante el software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO y Cambridge, UK), usando el método Chou-Talalay. Véase Chou y Talalay *et al.* (1984). El índice de combinación = $[D]_1 [D_x]_1 + [D]_2/[D_x]_2$, en la que $[D]_1$ y $[D]_2$ son las concentraciones requeridas por cada fármaco en combinación para lograr el mismo efecto que las concentraciones $[D_x]_1$ y $[D_x]_2$ de cada fármaco solo. Los valores inferiores a uno indican sinergia, mientras que los valores superiores a uno indican antagonismo.

Ejemplo 6: Estudios en ratones y obtención de imágenes *in vivo*

Se transdujeron células LT3-ITD-Ba/F3 con un retrovirus que codifica para luciferasa de luciérnaga (MSCV-Luc), y se seleccionaron con neomicina para generar la línea celular FLT3-ITD-Ba/F3-luciferasa (luc+). Las células libres de *Mycoplasma* y contaminación vírica se resuspendieron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Mediatech, Inc., VA) antes de su administración i.v. a ratones. Se diluyó un 6% p/p de PKC412 en Gelucire[®] 44/14 (Gattefosse, Francia) con 1 x PBS y se calentó en un baño de agua 42°C hasta que volvió líquido. Entonces se almacenó la disolución a 4°C hasta su uso para el tratamiento mediante sonda nasogástrica de ratones. Se preparó N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) humectando en primer lugar 10 mg de producto en polvo con 30 μl de agua, y luego disolviendo en dos equivalentes (0,73 μl/mg de compuesto) de HCl 6,0 N. La disolución resultante (transparente) se llevó hasta 1 ml en tampón de acetato pH

4,6, y la disolución madre resultante se almacenó congelada a -20°C hasta que se usó para el tratamiento mediante sonda nasogástrica de ratones.

Se administró a ratones atímicos NCr macho (de 5-6 semanas de edad; Taconic, NY) un total de 800.000 células FLT3-ITD-Ba/F3-luc+ mediante inyección en la vena de la cola. Se obtuvieron imágenes de los ratones y se cuantificó la luminiscencia corporal total tal como se describió anteriormente. Véase Armstrong *et al.* (2003). Se usó la obtención de imágenes de nivel inicial un día tras la inoculación de las células tumorales para establecer cohortes de tratamiento con carga tumoral correspondiente. Las cohortes de ratones se trataron con administración oral de vehículo, 40 mg/kg/día de PKC412 (formulado tal como anteriormente), 50 mg/kg de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) (formulado como anteriormente), o una combinación de PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242). Se realizó la obtención de imágenes repetida a diversos intervalos. Al final planificado del estudio (aproximadamente una semana tras la inyección i.v. inicial de células FLT3-ITD-Ba/F3-luc+), se sacrificaron los ratones, se registraron los pesos corporales y del bazo, y se preservaron los tejidos en formalina al 10% para el análisis histopatológico.

Ejemplo 7: Efectos de la combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-iletil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 frente a células resistentes y sensibles a PKC412

Se sometió a prueba N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) en combinación con PKC412 frente a células FLT3-ITD-Ba/F3. Se observaron efectos de potenciación positiva entre los dos agentes, véanse la figura 1 y la tabla I siguiente, que muestra los índices de combinación calculados para las curvas de respuesta a la dosis mostradas en las figuras 1 y 2. El análisis de los efectos combinados de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 usando el software Calculus muestra efectos sinérgicos en un intervalo de dosis (DE50-DE90), tal como se representa en la tabla I. También se sometió a prueba N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 en combinación frente a la línea celular MV4;11, la línea celular que expresa FLT3-ITD de leucemia aguda humana, y se encontró que ambos agentes potencian la inhibición de la proliferación celular en comparación con cada fármaco solo a dosis superiores, tal como se representa en la tabla I. El análisis de Calculus de los efectos combinados de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 sugiere de sinergia moderada a sinergia a dosis superiores (DE75-DE90), observándose antagonismo a dosis inferiores (DE50) tal como se representa en la tabla I. También se investigaron los efectos combinados de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilaminopropionamida (LBW242) y PKC412 frente a las líneas celulares que expresan FLT3 mutante resistentes a PKC412, A627T-FLT3-Ba/F3, F6911-FLT3-Ba/F3, G697R-FLT3-Ba/F3, y N676D-FLT3-Ba/F3. Se observan efectos sinérgicos para N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 frente a las líneas A627T-FLT3-Ba/F3 y F6911-FLT3-Ba/F3 (DE50-DE90), y se observó sinergia para N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 frente a la línea G697R-FLT3-Ba/F3 (DE50-DE90), véase la figura 2 y la tabla I. Para la línea celular N676D-FLT3-Ba/F3, los resultados de la combinación muestran un efecto aditivo (DE50-DE90) entre N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, tal como se presenta en la tabla I.

Tabla I

Índices de combinación:

| Líneas celulares | DE50 | DE75 | DE90 |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| FLT3-ITD-Ba/F3 | 0,74780 | 0,58808 | 0,47158 |
| MV4;11 | 1,98810 | 0,75339 | 0,40562 |
| A627T-Ba/F3 | 0,55582 | 0,40946 | 0,36244 |
| F6911-Ba/F3 | 0,63409 | 0,43267 | 0,30145 |
| G697R-Ba/F3/N676D-Ba/F3 | 0,39783 | 0,43210 | 0,47464 |
| | 1,06409 | 1,04265 | 1,02238 |

Ejemplo 8: Los estudios de proliferación muestran los efectos de la combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y doxorubicina o Ara-c, respectivamente, frente a células que expresan FLT3 mutante resistentes y sensibles a PKC412

Los efectos combinados entre PKC412 y agentes quimioterápicos convencionales, tales como doxorubicina y Ara-c, frente a células FLT3-ITD-Ba/F3 muestran sinergia para la combinación de PKC412 y doxorubicina en un intervalo de dosis (DE50-DE90), véase la figura 3 y la tabla II, que muestra los índices de combinación calculados para las curvas de dosis-respuesta mostradas en las figuras 3 y 4. El análisis de Calcsyn de los efectos combinados de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidropirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y doxorubicina frente a células FLT3-ITD-Ba/F3 muestra efectos sinérgicos en un intervalo de dosis (DE50-DE90), véase la figura 4 y la tabla II. Los resultados del análisis de Calcsyn de los efectos combinados de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y doxorubicina frente a células F6911-FLT3-Ba/F3 muestran adición a los efectos sinérgicos sólo en el intervalo superior de dosis (DE75-DE90), véase la tabla II. Para las células A627T-FLT3-Ba/F3, se encontró que N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y doxorubicina actúan sinérgicamente (DE50-DE90), véase la tabla II. Se observa sinergia entre N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y Ara-c para las células FLT3-ITDBa/ F3 (DE50-DE90), véase la figura 5 y la tabla II y para las células F6911-FLT3-Ba/F3 y las células A627T-FLT3-Ba/F3 (DE50-DE90), véase la tabla II.

Tabla II

Índices de combinación:

| Líneas celulares | DE50 | DE75 | DE90 |
|---|---------|---------|---------|
| FLT3-ITD-Ba/F3 (LBW242+Ara-c) | 0,60784 | 0,45149 | 0,33535 |
| A627T-Ba/F3 (LBW242+Ara-c) | 0,70378 | 0,52217 | 0,38742 |
| F6911-Ba/F3 (LBW242+Ara-c) | 0,60377 | 0,47024 | 0,41785 |
| FLT3-ITD-Ba/F3 (LBW242+doxorubicina) | 0,89723 | 0,81295 | 0,73688 |
| A627T-Ba/F3 (LBW242+doxorubicina) | 0,38613 | 0,35638 | 0,35964 |
| F6911-Ba/F3 (LBW242+doxorubicina) | 1,35772 | 0,92381 | 0,67332 |
| FLT3-ITD-Ba/F3 (PKC412+doxorubicina) | 0,66838 | 0,69476 | 0,72401 |
| FLT3-ITD-Ba/F3 (PKC412+Ara-c) | 1,35975 | 1,17660 | 1,02362 |

Ejemplo 9: Investigación *in vivo* de los efectos de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, solos y combinados

Para evaluar directamente la eficacia antitumoral *in vivo* de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) sola, PKC412 solo, y la combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrolol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, se estudia un modelo de ratón de leucemia aguda en el que se cuantifica la carga tumoral mediante obtención de imágenes no invasiva de células tumorales luminiscentes. Figura 6.

Se modifican por ingeniería genética células FLT3-ITD-Ba/F3 murinas para que expresen de manera estable luciferasa de luciérnaga, y entonces se inoculan ratones atímicos NCr con estas células. Se usa obtención de imágenes no invasiva para evaluar en serie la carga tumoral, y los ratones con leucemia establecida se dividen en cohortes con carga tumoral similar.

- 5 Entonces se administra PKC412, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilaminopropionamida (LBW242) o PKC412 combinado con N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) mediante sonda nasogástrica oral, puesto que es el vehículo. La administración de ambos agentes juntos se realiza mediante sonda nasogástrica con un agente aproximadamente 20-30 minutos antes de la administración mediante sonda nasogástrica del otro agente.
- 10 A los ratones se les administra el vehículo solo, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) (50 mg/kg), PKC412 (40 mg/kg) o una combinación de ambos N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, véase la figura 6.

- 15 Se observa que la carga tumoral inferior evaluada mediante bioluminiscencia está en el grupo de combinación de fármacos en los días 5 y 7 tras la inyección i.v. de células FLT3-ITD-Ba/F3-luc+ (y que corresponde a 4 y 6 días de tratamiento farmacológico, respectivamente), véanse las figuras 6 y 7. Se usa la prueba de la t de Student para la evaluación estadística de los resultados de bioluminiscencia tal como se observan en el día 7 tras la inyección i.v.: p<0,056247 (vehículo frente a N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) sola); p<0,04825 (vehículo frente a PKC412 solo); p<0,04329 (vehículo frente a N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, combinados). La evaluación estadística (mediante la prueba de la t de Student) para el día 5 tras la inyección i.v. dio: p<0,077299 (vehículo frente a N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) sola); p<0,075852 (vehículo frente a PKC412 solo); p<0,06826 (vehículo frente a N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412, combinados). Se observan pesos en porcentaje del bazo inferiores en los ratones tratados con la combinación de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 tras el sacrificio 8 días tras el último de día de obtención de imágenes, véase la figura 8.

30 **Ejemplo 10: Efectos de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) sobre la resistencia mediada por estroma de células que expresan FLT3 mutante a PKC412**

Se estudia la capacidad de respuesta de células Ba/F3-FLT3-ITD en cultivo en presencia y ausencia de WEHI (usado como fuente de IL-3) a los efectos citotóxicos de PKC412, y se encuentra que la presencia de IL-3 protege completamente a las células de la inhibición por PKC412 de la proliferación celular (datos complementarios).

- 35 A diferencia de PKC412, el inhibidor de IAP, N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242), inhibe la proliferación de células Ba/F3-FLT3-ITD tanto en ausencia, como en presencia de IL-3. Resulta interesante que la administración simultánea de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) y PKC412 inhibe sinérgicamente el crecimiento de células Ba/F3-FLT3-ITD cultivadas en presencia de IL-3; esta inhibición es de grado similar a la lograda con la coadministración de ambos agentes en ausencia de IL-3, lo que sugiere que un inhibidor de IAP puede potenciar los efectos de un inhibidor de FLT3 y anular la quimiorresistencia debida a la provisión de señales de disponibilidad.

- 40 Se usan las líneas celulares estromales humanas, HS-5, en combinación con la línea FLT3 AML mutante, MOLM-13. Con el fin de medir sólo el componente leucémico, se introduce luciferasa en las células leucémicas de modo que se cuantifica específicamente el número de células viables usando emisión de luz. En el estudio mostrado en la figura 45 9, se exponen células MOLM-13-luc+ (40.000/pocillo) a PKC412 en presencia o ausencia de una monocapa casi confluyente de células estromales HS-5. La línea de células estromales potencia su crecimiento y protege parcialmente frente a los efectos inhibitorios de PKC412, véase la figura 9. Tal como se observa con Ba/F3-FLT3-ITD, se observa la cooperación positiva entre PKC412 y N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) en la eliminación de la línea celular humana que expresa FLT3-ITD, MOLM13-luc+, en ausencia de factor de crecimiento. N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirrol[2,3-c]piridin-1-il-etil]-2-metilamino-propionamida (LBW242) potencia de manera similar los efectos citotóxicos de PKC412 frente a las células MOLM13-luc+ tanto en ausencia de células estromales humanas HS-5 como en su presencia (véase la figura 9B). Los resultados apoyan la idea de que las señales de viabilidad mediadas por el estroma pueden contribuir a la quimiorresistencia a los inhibidores de FLT3 (tal como PKC412) observada en 50 médula ósea, y que esa resistencia pueden vencerse mediante la inclusión de tratamiento con inhibidor de IAP.

55 **Ejemplo 11: Regulación de IAP mediante FLT3 mutante**

Se estudia la expresión de un panel de factores de señalización anti-apoptóticos, incluyendo sustratos de IAP de N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenil-octahidro-pirrolidino[2,3-c]piridin-1-il-etil)-2-metilamino-propionamida (LBW242), y Bcl-2 y BclxL, en células que expresan FLT3 mutante. Sólo se observan fluctuaciones moderadas en la expresión de las proteínas XIAP, Bcl-2, y BclxL en células Ba/F3 que expresan FLT3-ITD, en comparación con las células Ba/F3 parentales, sin cambio detectable en la expresión de CIAP1, y ausencia de efecto de IL-3 sobre los niveles de proteínas tras 2 días de exposición de las células al factor de crecimiento, véase la figura 10. El tratamiento de las células FLT3-ITD-Ba/F3 con PKC412 0,1 μ M durante 22 horas condujo a una disminución parcial en la expresión de las proteínas BclxL y XIAP, lo que sugiere que FLT3 regula la expresión de estas proteínas, véase la figura 10.

Ejemplo 12: Análisis de apoptosis y viabilidad celular

El ensayo de exclusión con azul trípiano se ha descrito anteriormente [véase Weisberg *et al.* (2002)], y se usó para determinar la proliferación de células en cultivo en presencia y ausencia de PKC412 y (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida. La viabilidad celular se notifica como porcentaje de células control (no tratadas). Las barras de error representa el error estándar de la media para cada punto de datos. Se midió la apoptosis de las células tratadas con fármaco usando el kit de tinción Annexin-V-Fluos (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), tal como se ha descrito anteriormente. Véase Weisberg *et al.* (2002).

Ejemplo 13: Estudios de combinación de fármacos PKC412 y (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y)

Para los estudios de combinación de fármacos, se añaden PKC412 y (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) simultáneamente a razones fijas a células FLT3-ITD-Ba/F3 o células que expresan MOLM13-luc+ FLT3 derivadas de AML. La viabilidad celular se determina usando el ensayo de exclusión con azul trípiano, y se expresa como la función de células tratadas con fármaco con crecimiento afectado (FA) frente a células control, véase la figura 11.

Ejemplo 14: Efectos de la combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y PKC412 frente células sensibles a PKC412

Se somete a prueba (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) en combinación con PKC412 frente a células FLT3-ITD-Ba/F3. Se observan efectos de potenciación positiva entre los dos agentes, véase la figura 12.

También se someten a prueba (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y PKC412 en combinación frente a la línea celular que expresa FLT3-ITD de leucemia aguda humana, MOLM13-luc+, véase la figura 11 y se encontró que ambos agentes potencian la inhibición de la proliferación celular en comparación con cada fármaco solo a las dosis superiores sólo.

Ejemplo 15: Los estudios de proliferación muestran los efectos de la combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y doxorubicina o Ara-c, frente a células que expresan FLT3 mutante sensibles a PKC412

Los efectos combinados entre PKC412 y agentes quimioterápicos convencionales, tales como doxorubicina y Ara-c, frente a células FLT3-ITD-Ba/F3 muestran efectos de potenciación positiva para la combinación de PKC412 y doxorubicina en un intervalo de dosis (DE50-DE90), véanse las figuras 13-15.

Ejemplo 16: Investigación *in vivo* de los efectos de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y PKC412, solos y combinados

Para evaluar directamente la eficacia antitumoral *in vivo* de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) solo, PKC412 solo y la combinación de (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) y PKC412, se estudia un modelo de ratón de leucemia aguda en el que se cuantifica la carga tumoral mediante obtención de imágenes no invasiva de células tumorales luminiscentes. Figura 16.

Se modifican por ingeniería genética células FLT3-ITD-Ba/F3 murinas para que expresen de manera estable luciferasa de luciérnaga, y entonces se inoculan ratones atímicos NCr con estas células. Se usa obtención de imágenes no invasiva para evaluar en serie la carga tumoral, y los ratones con leucemia establecida se dividen en cohortes con carga tumoral similar.

Entonces se administran PKC412, (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida o PKC412 combinado con (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-

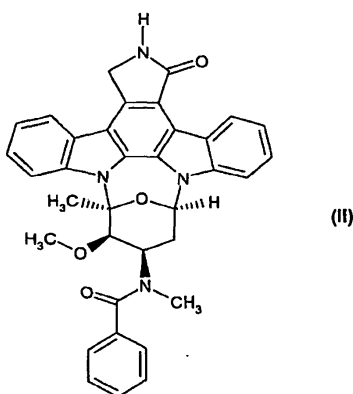
2-il]-pirrolidin-1-il}-2oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) mediante sonda nasogástrica oral, puesto que es el vehículo. La administración de ambos agentes juntos se realiza mediante sonda nasogástrica con un agente aproximadamente 20-30 minutos antes de la administración mediante sonda nasogástrica del otro agente. A los ratones se les administró el vehículo solo, (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) (50 mg/kg), PKC412 (40 mg/kg) o una combinación de tanto (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluoro-benzoil)-tiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2oxo-etil)-2-metilamino-propionamida (compuesto Y) como PKC412, véase la figura 16. Se observa que la carga tumoral inferior evaluada mediante bioluminiscencia (fotones/segundo) está en el grupo de combinación de fármacos en el día 8 tras la inyección i.v. de células FLT3-ITD-Ba/F3-luc+ (y que corresponde a 8 días de tratamiento farmacológico, respectivamente), véase la figura 16.

REIVINDICACIONES

1. Combinación que comprende un compuesto (I) que es N-[1-ciclohexil-2-oxo-2-(6-fenetil-octahidro-pirroló[2,3-c]piridin-1-il-etil)-2-metilamino-propionamida o un compuesto (Ia) que es (S)-N-((S)-1-ciclohexil-2-((S)-2-[4-(4-fluorobenzoyl)-thiazol-2-il]-pirrolidin-1-il)-2-oxo-etil)-2-metilamino-propionamida en combinación con uno o más de los siguientes:

5

(b) un compuesto de la fórmula (II):



o una sal del mismo;

(c) doxorubicina; y

10 (d) citarabina.

2. Composición farmacéutica que comprende la combinación según la reivindicación 1.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, opcionalmente junto con un vehículo farmacéutico.

4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto (I) o (Ia) según la reivindicación 1, en combinación con una composición farmacéutica que comprende el compuesto (II), doxorubicina o citarabina según la reivindicación 1.

15 5. Combinación según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de un animal de sangre caliente que tiene leucemia mieloide aguda (AML).

6. Combinación para su uso según la reivindicación 5, en la que la leucemia mieloide aguda (AML) es resistente a la quimioterapia convencional.

7. Combinación para su uso según la reivindicación 5 y 6, en la que el animal de sangre caliente es un ser humano.

20 8. Combinación para su uso según la reivindicación 7, en la que el ser humano es un ser humano joven.

9. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML).

10. Uso de la combinación según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML).

25 11. Uso de una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para la preparación de un medicamento para la leucemia mieloide aguda (AML).

12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que la leucemia mieloide aguda (AML) es resistente a la quimioterapia convencional.

30 13. Envase comercial que comprende una combinación según la reivindicación 1 junto con instrucciones para su uso simultáneo, separado o secuencial del mismo en el tratamiento de la AML.

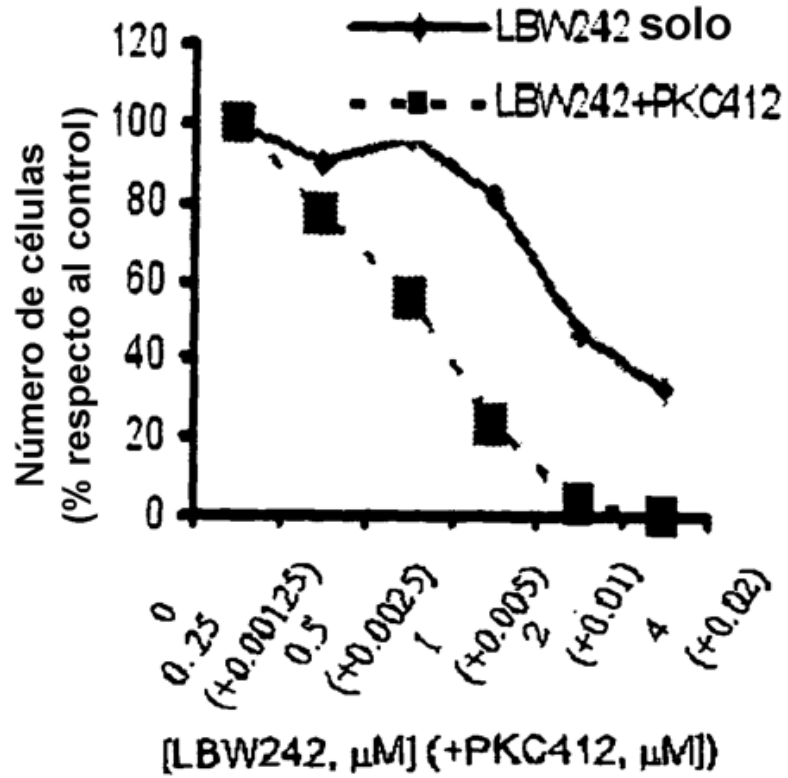
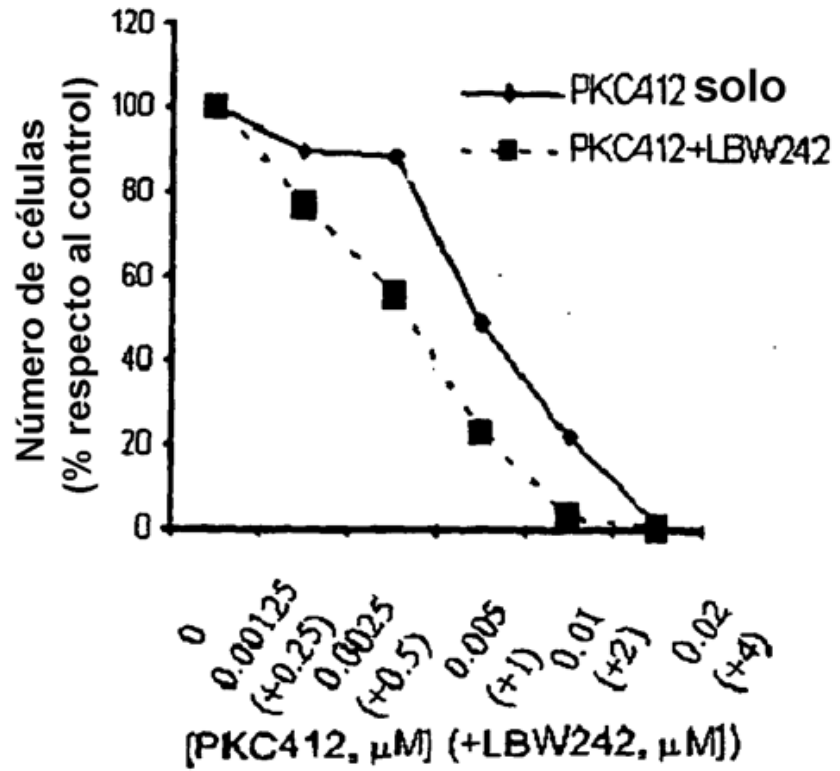


Figura 1

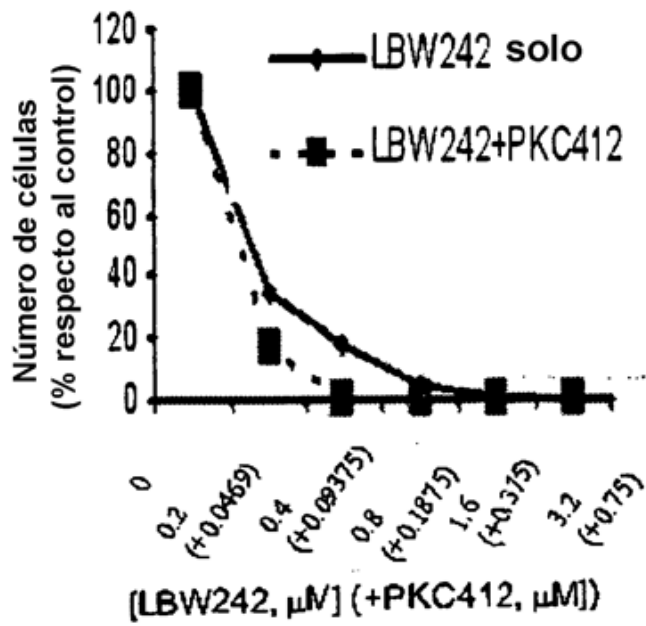
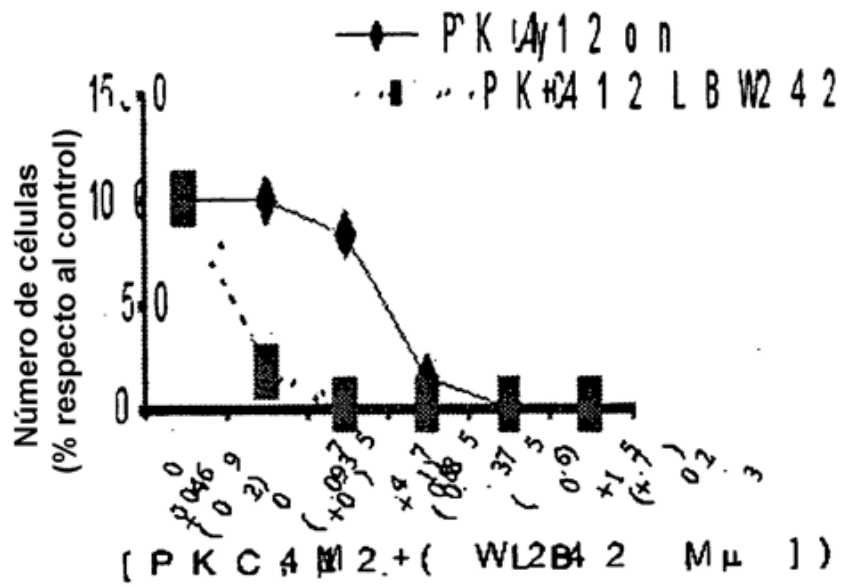


Figura 2

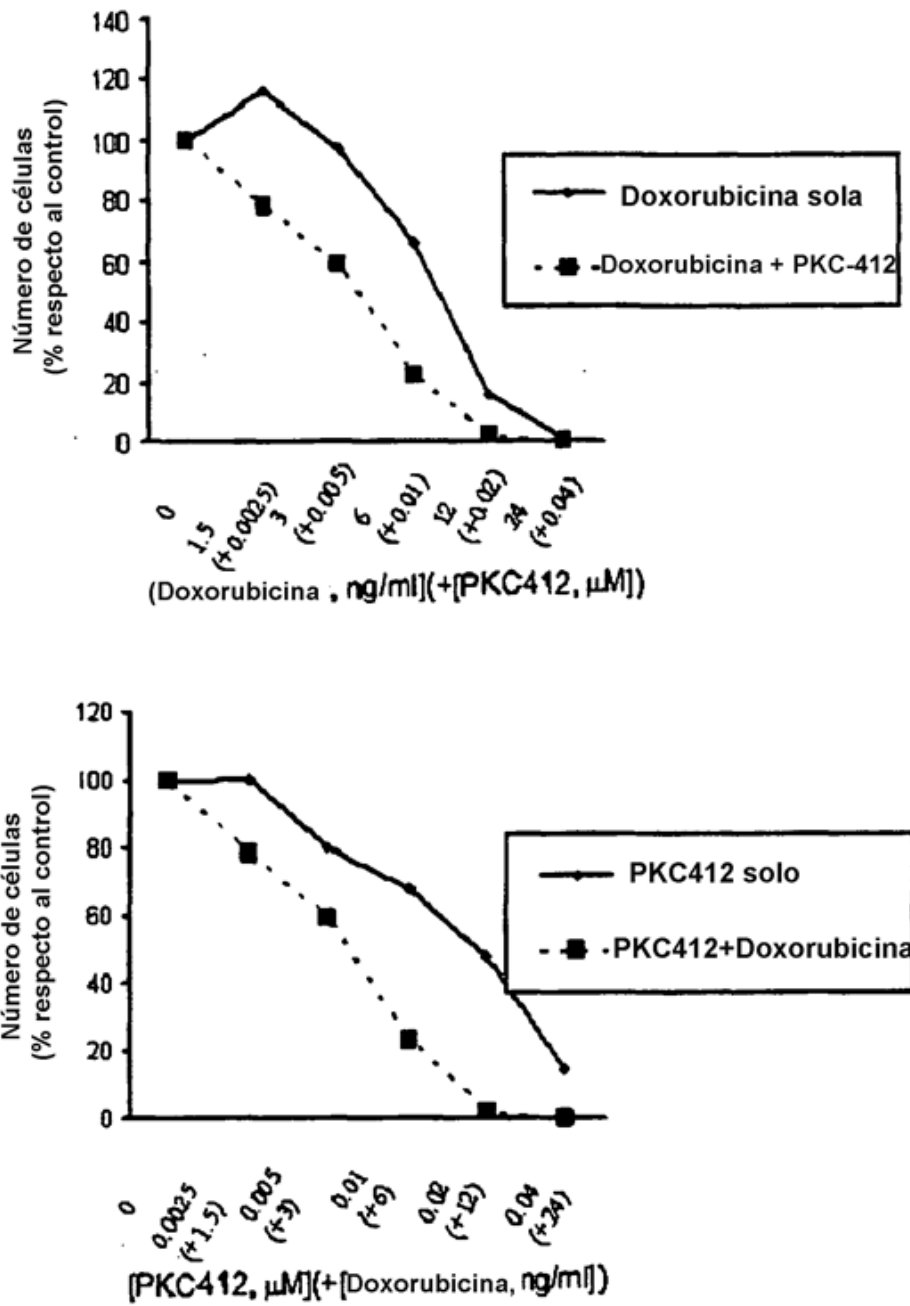


Figura 3

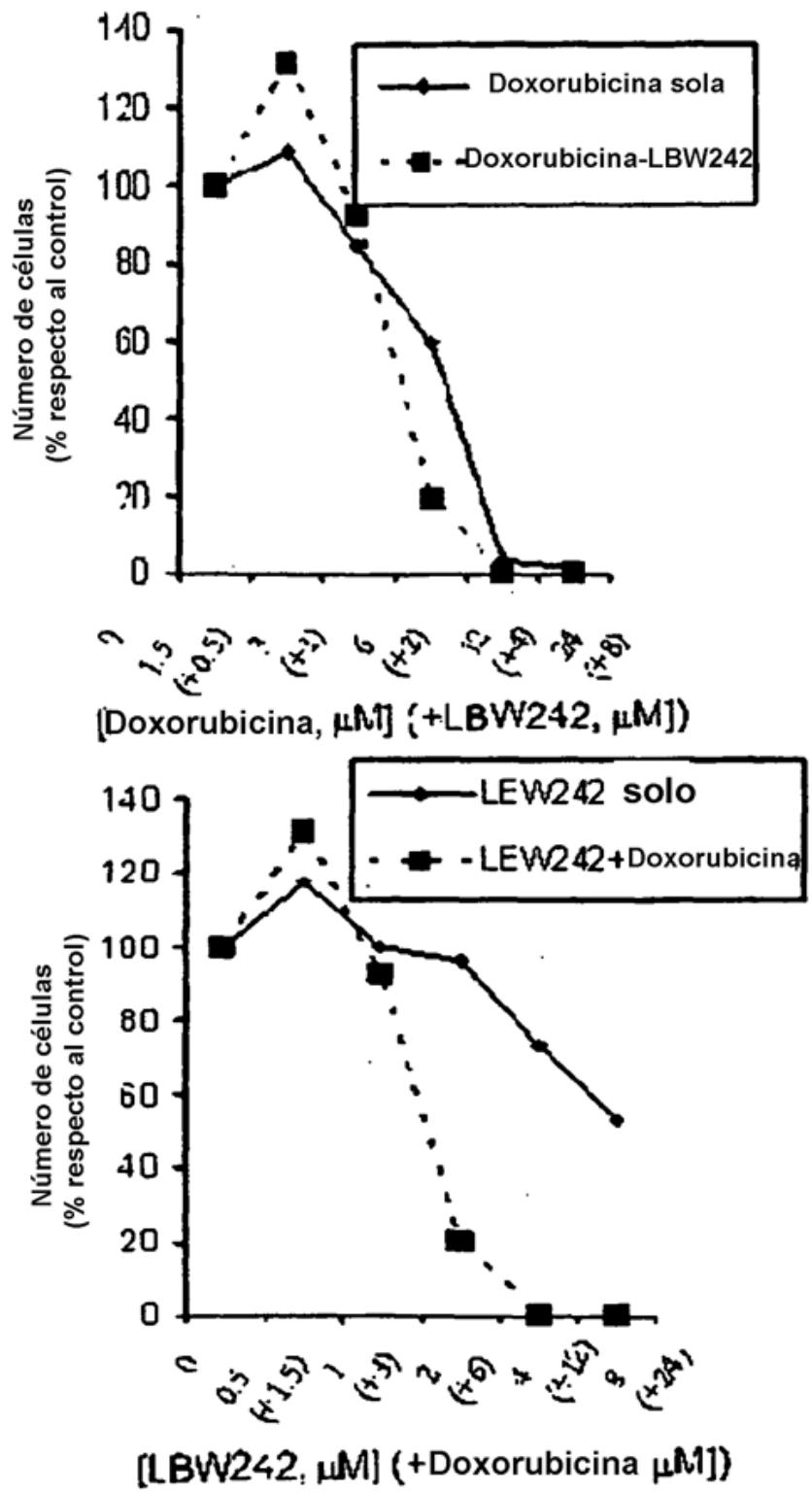


Figura 4

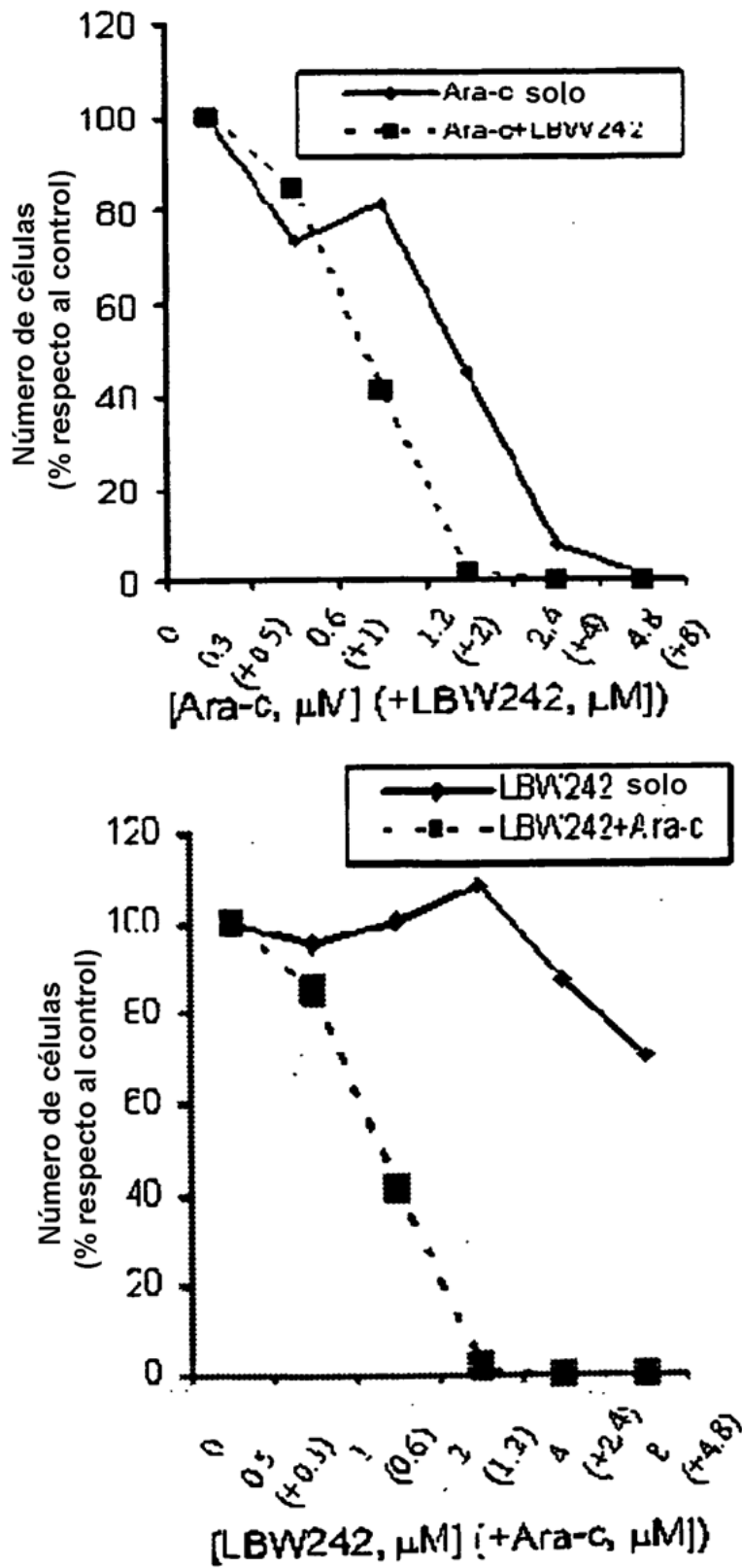


Figura 5

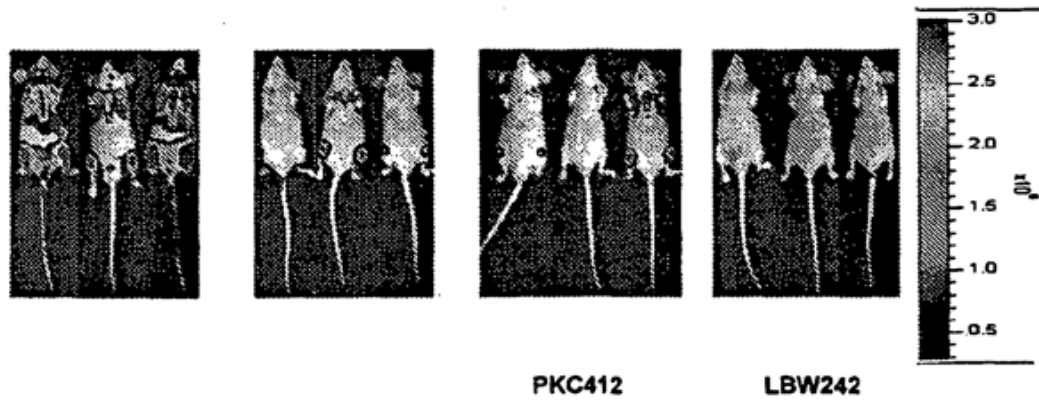


Figura 6

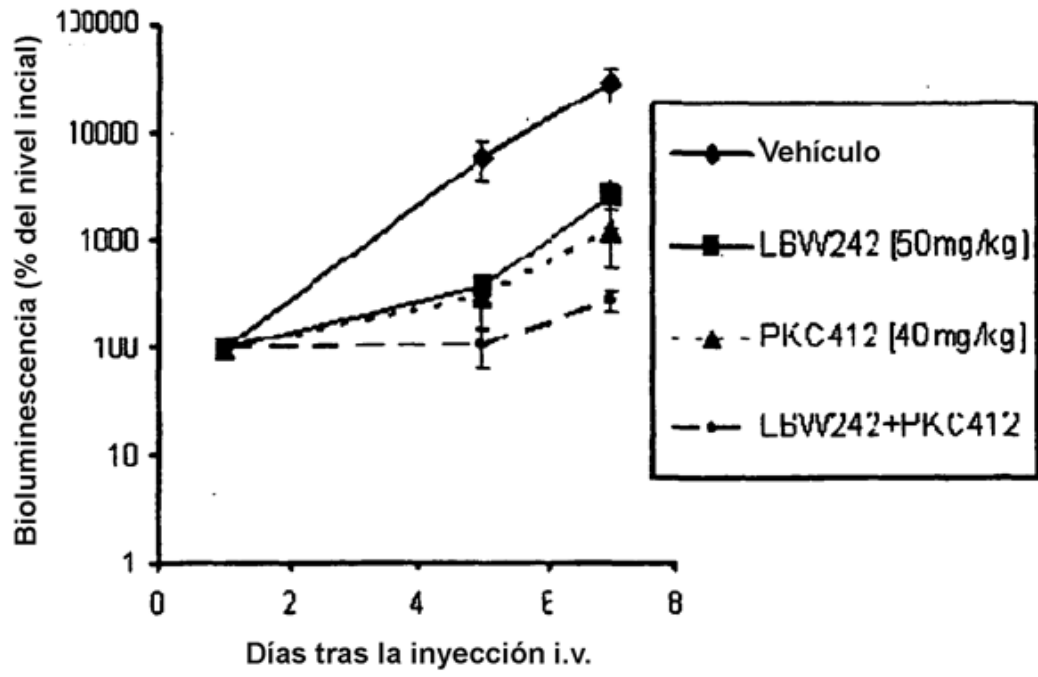


Figura 7

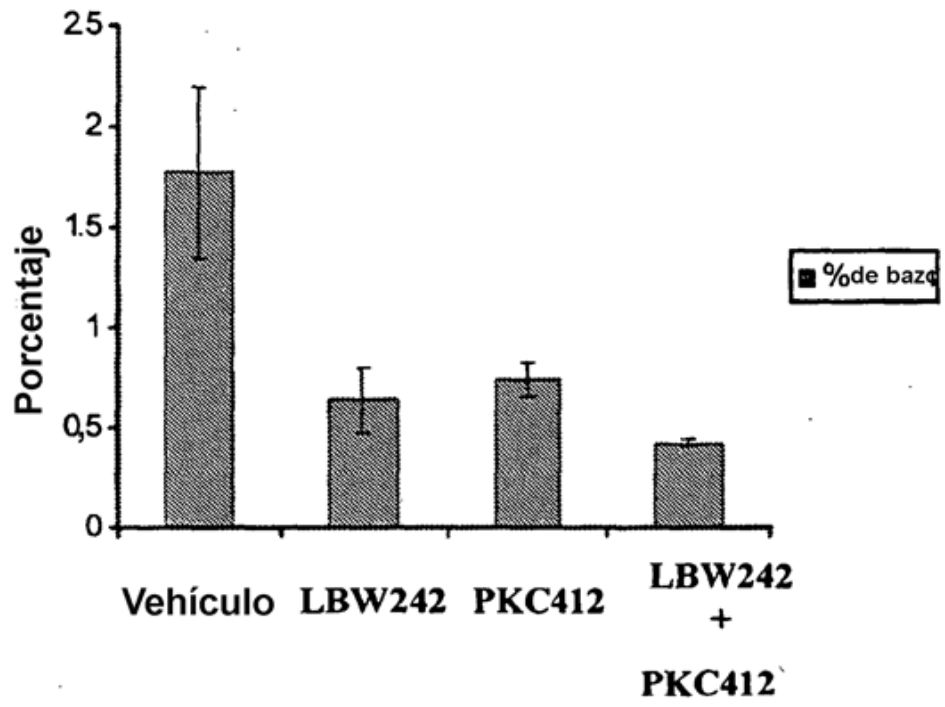


Figura 8

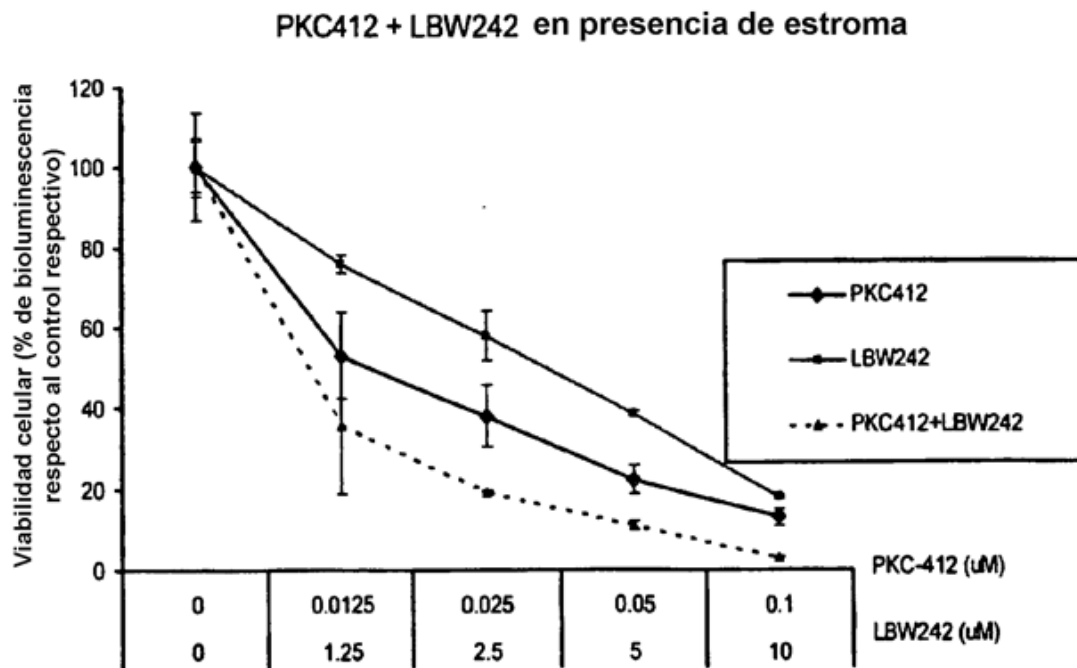
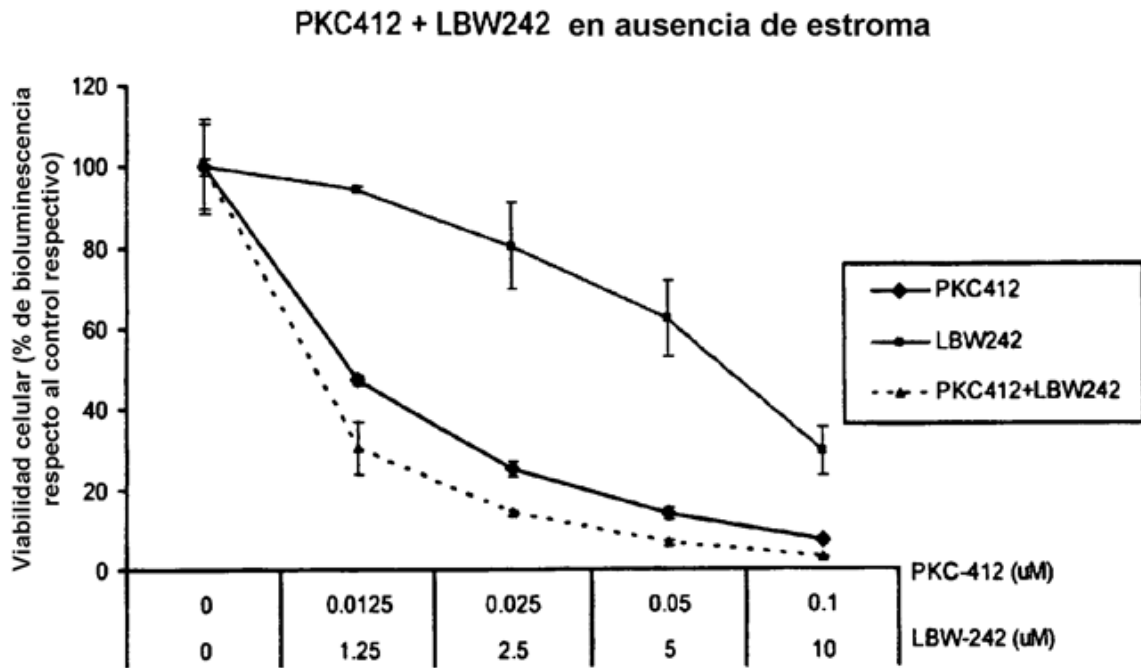


Figura 9

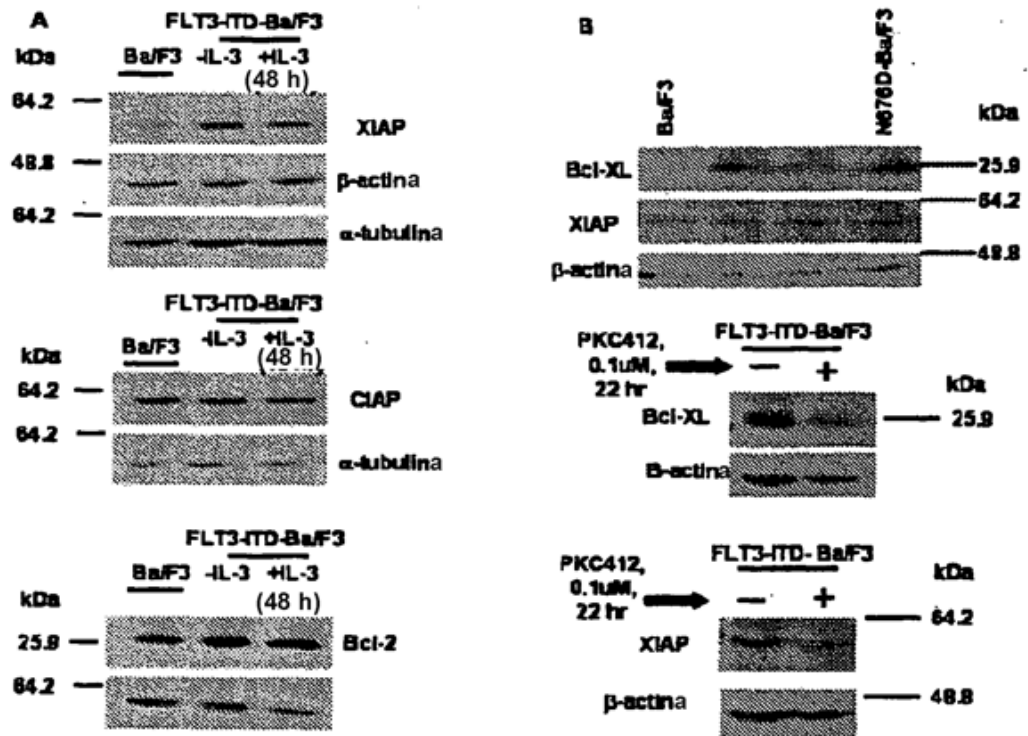


Figura 10

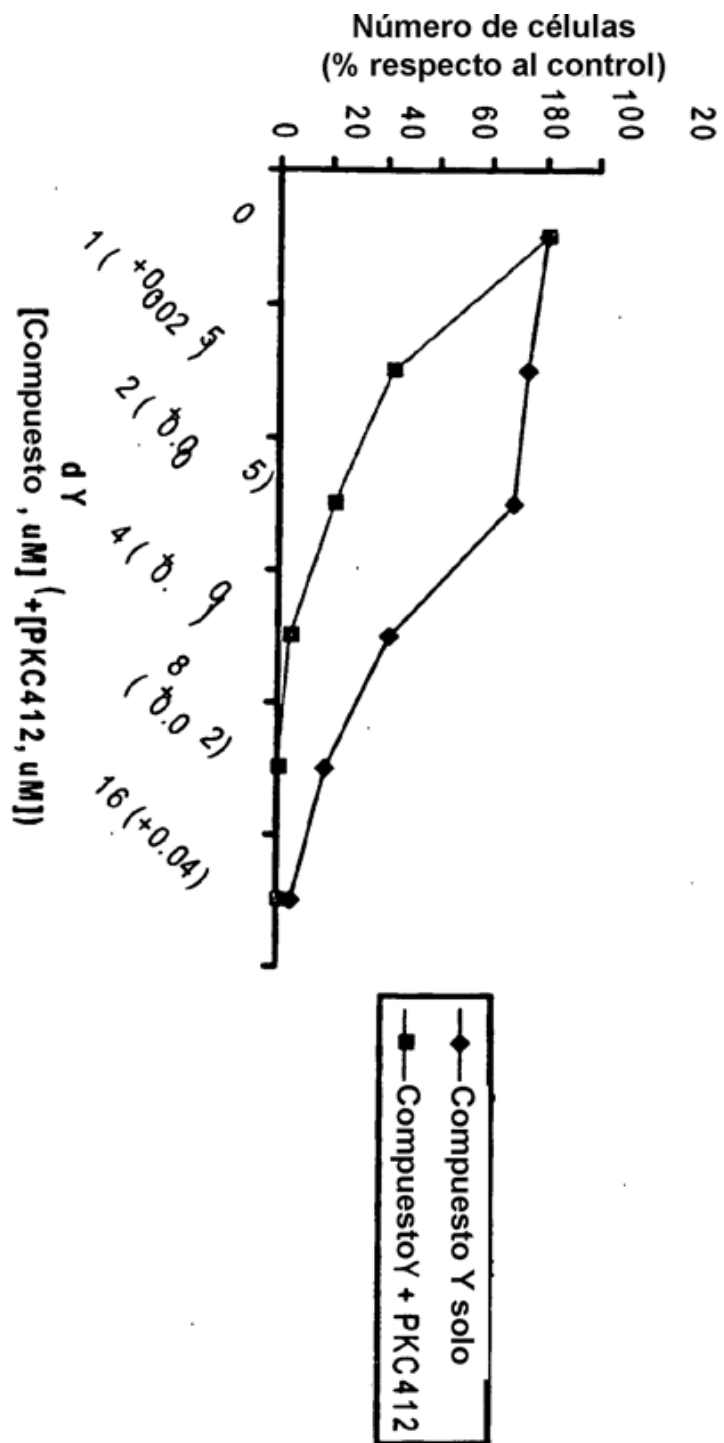


Figura 11

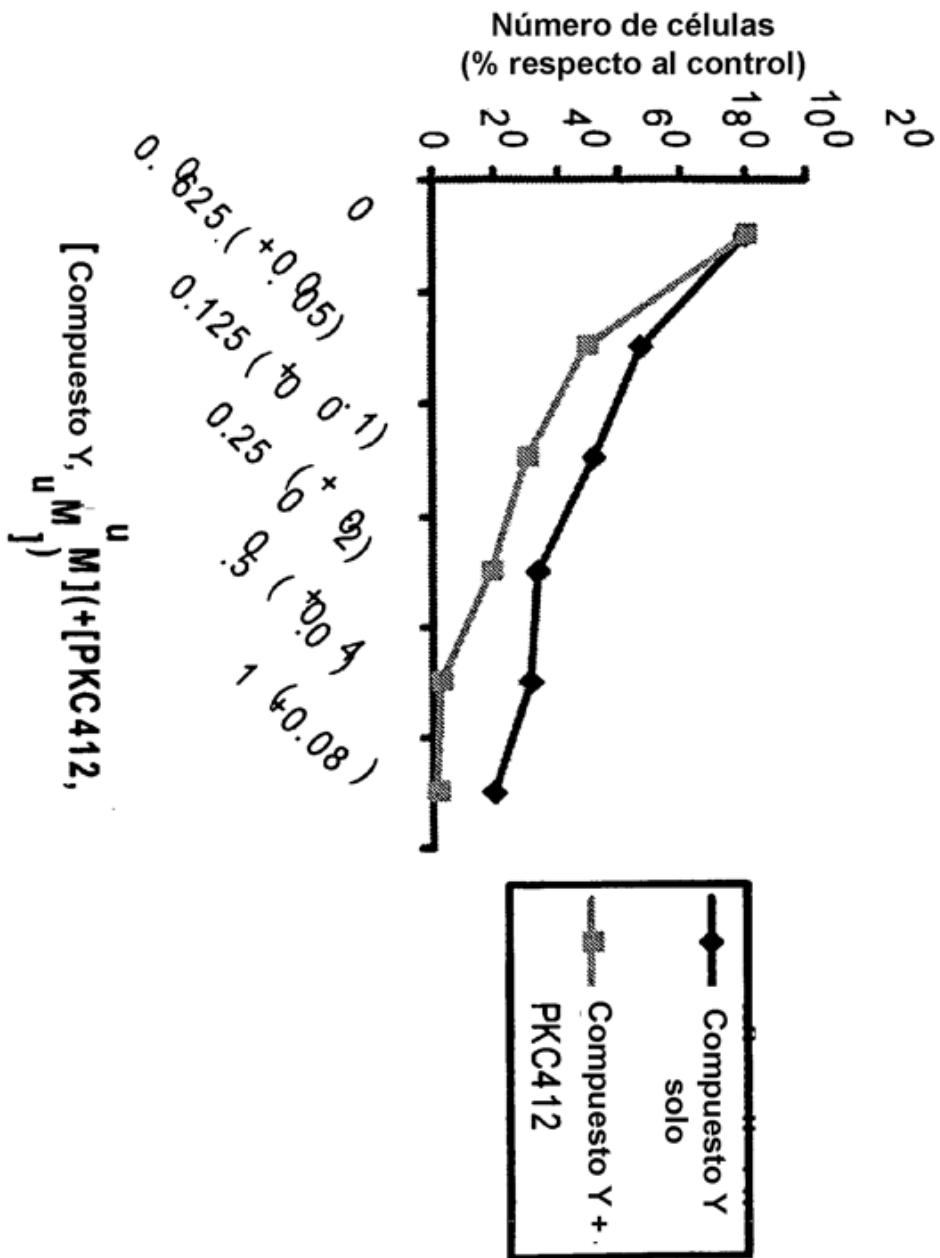


Figura 12

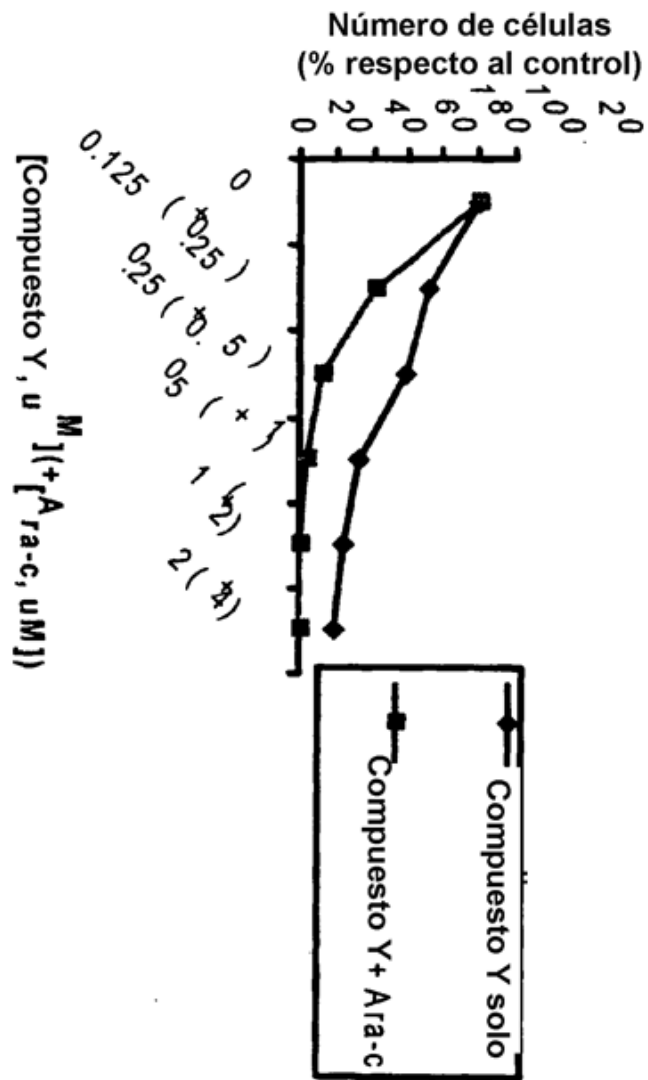


Figura 13

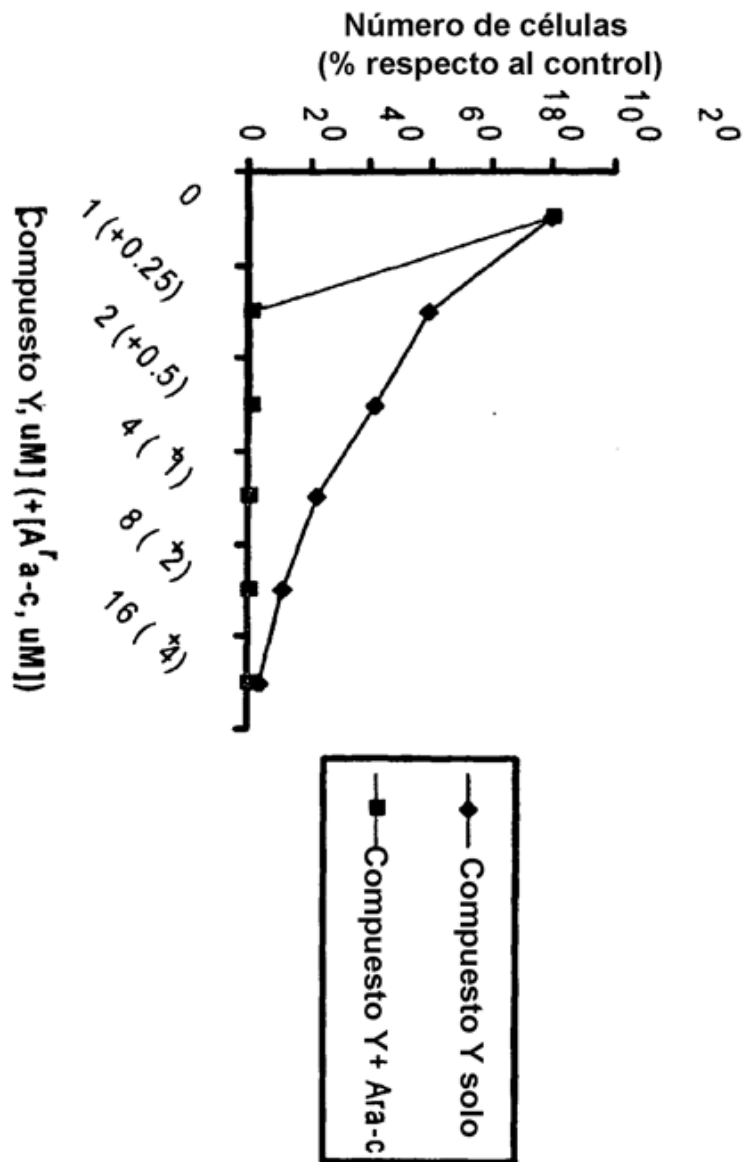


Figura 14

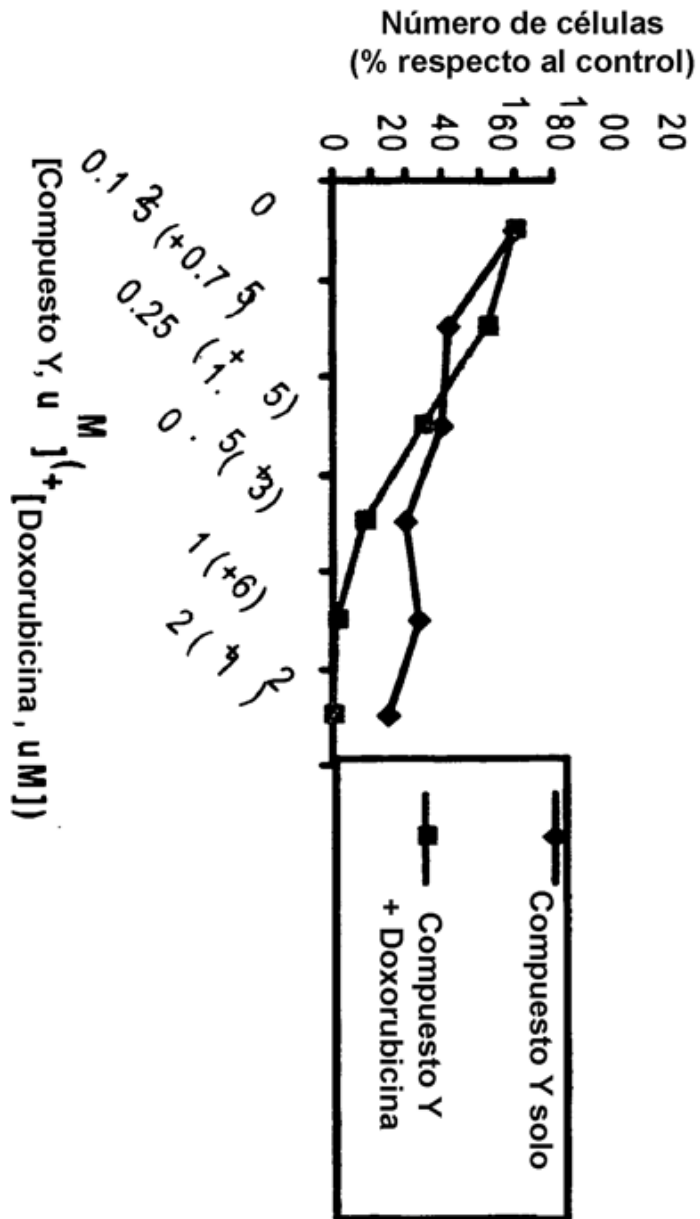


Figura 15

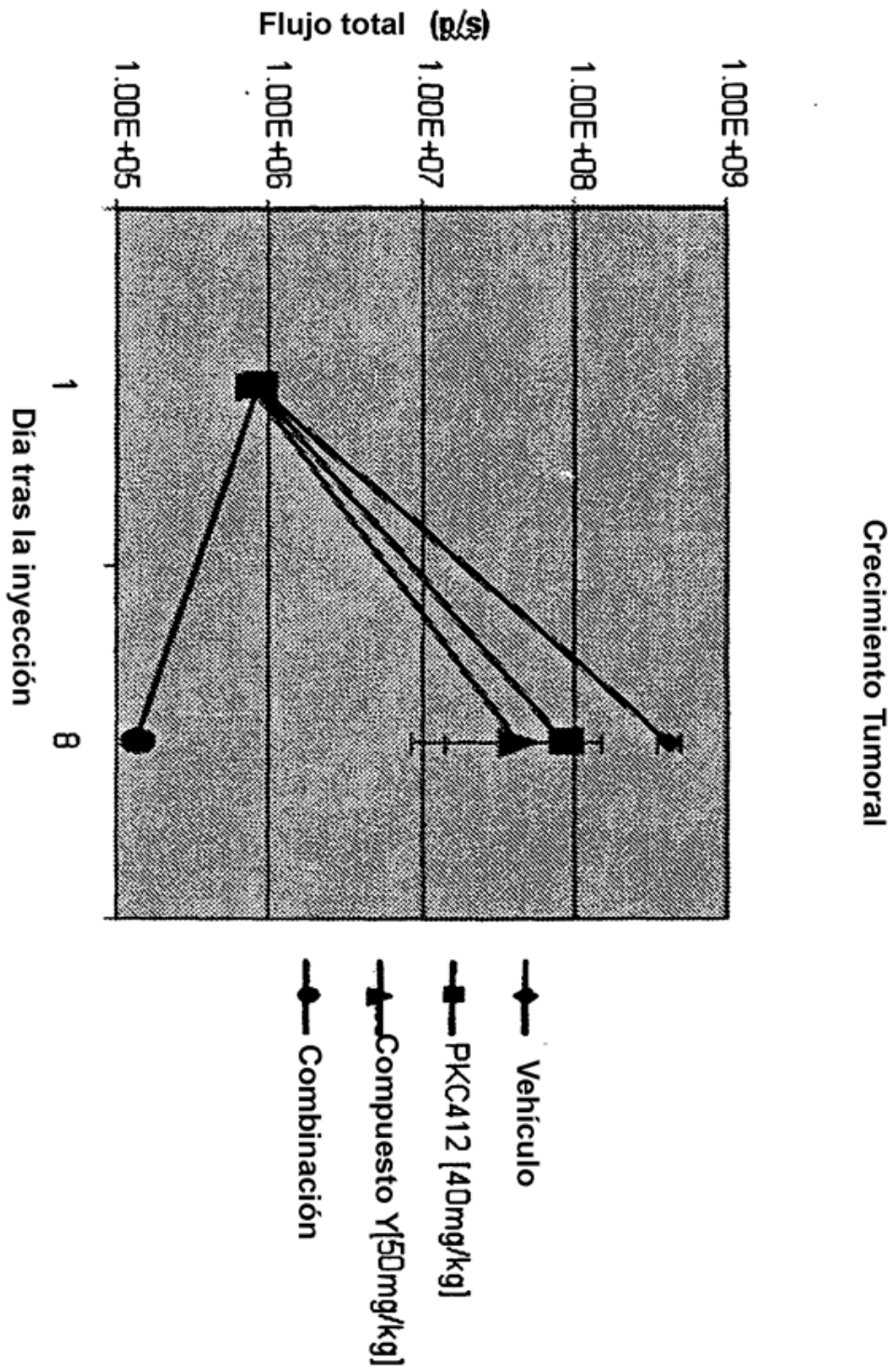


Figura 16