

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 570**

51 Int. Cl.:
A61K 31/497 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06733986 .1**
96 Fecha de presentación: **27.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1845990**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54 Título: **TRATAMIENTO DE TUMORES METASTALIZADOS.**

30 Prioridad:
27.01.2005 US 647568 P
06.04.2005 US 669245 P
29.09.2005 US 722053 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
INTELLECTUAL PROPERTY - R440 P.O. BOX
8097
EMERYVILLE, CA 94662-8097, US

72 Inventor/es:
LOPES DE MENEZES, Daniel;
HEISE, Carla y
XIN, Xiaohua

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

ES 2 374 570 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de tumores metastatizados

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere generalmente a composiciones para tratar tumores metastatizados en sujetos. Más particularmente, la presente invención proporciona el uso de un compuesto tal como 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona y tautómeros, sales y mezclas del mismo en el tratamiento y la preparación de medicamentos para tratar tumores metastatizados.

Antecedentes de la invención

10 Los capilares llegan a casi todos los tejidos del cuerpo humano y suministran oxígeno y nutrientes a los tejidos así como eliminan los productos de desecho. En condiciones habituales, las células endoteliales que revisten los capilares no se dividen, y los capilares, por tanto, normalmente no aumentan en número o tamaño en un ser humano adulto. En determinadas condiciones normales, sin embargo, tales como cuando se daña un tejido, o durante determinadas partes del ciclo menstrual, los capilares empiezan a proliferar rápidamente. Este proceso de formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes se conoce como angiogénesis o neovascularización. Véase Folkman, J. *Scientific American* 275,150-154 (1996). La angiogénesis durante la cicatrización de heridas es un ejemplo de neovascularización fisiopatológica durante la vida adulta. Durante la cicatrización de heridas, los capilares adicionales proporcionan un suministro de oxígeno y nutrientes, promueven el tejido de granulación, y ayudan en la eliminación de desechos. Tras la finalización del proceso de cicatrización, los capilares normalmente experimentan regresión. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, Universidad de Helsinki, Laboratorio de Biología Molecular/del Cáncer Biology y Departamento de Patología, Instituto Haartman, (1999).

25 La angiogénesis también desempeña un papel importante en el crecimiento de células cancerosas. Se sabe que una vez que un nido de células cancerosas alcanza un determinado tamaño, de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, las células cancerosas deben desarrollar un riego sanguíneo con el fin de que el tumor crezca más ya que la difusión no será suficiente para suministrar a las células cancerosas suficiente oxígeno y nutrientes. Por tanto, se espera que la inhibición de la angiogénesis detenga el crecimiento de células cancerosas.

30 Las tirosina cinasas receptoras (las RTK) son polipéptidos transmembrana que regulan la diferenciación y el crecimiento celular en el desarrollo, remodelación y regeneración de tejidos de adulto. Mustonen, T. *et al.*, *J. Cell Biology* 129, 895-898 (1995); van der Geer, P. *et al.* *Ann Rev. Cell Biol.* 10, 251-337 (1994). SE sabe que los ligandos de polipéptidos conocidos como factores de crecimiento o citocinas activan las RTK. La señalización de las RTK implica la unión de ligandos y un cambio en la conformación en el dominio externo del receptor dando como resultado su dimerización. Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factor and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, Universidad de Helsinki, Laboratorio de Biología Molecular/del Cáncer Biology y Departamento de Patología, Instituto Haartman, (1999); Ullrich, A. *et al.*, *Cell* 61, 203-212 (1990). La unión del ligando a la RTK da como resultado la transfosforilación del receptor en residuos de tirosina específicos y la posterior activación de los dominios catalíticos para la fosforilación de sustratos citoplasmáticos. *Id.*

40 Dos subfamilias de RTK son específicas para el endotelio vascular. Éstas incluyen la subfamilia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la subfamilia de receptores Tie. Las RTK de clase V incluyen VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR (humano), Flk-1 (de ratón) y VEGFR3 (FLT-4). Shibuya, M. *et al.*, *Oncogene* 5, 519-525 (1990); Terman, B. *et al.*, *Oncogene* 6, 1677-1683 (1991); Aprelikova, O. *et al.*, *Cancer Res.* 52, 746-748 (1992).

45 El cáncer es una enfermedad que implica múltiples defectos genéticos que dirigen proliferación de células tumorales. Por tanto, las estrategias que inhiben simultáneamente múltiples rutas de señalización celular pueden conducir a desenlaces terapéuticos más favorables. La sobreexpresión de RTK y/o mutaciones activantes están presentes a menudo en las células tumorales y están implicadas en el crecimiento tumoral. Blume-Jensen, P y Hunter, T., "Oncogenic Kinase Signaling," *Nature*, 411, págs. 355-65 (2001); Carmeliet, P., "Manipulating Angiogenesis in Medicine", *J. Intern. Med.*, 255, págs. 538-61 (2004). La mayoría de las RTK comprenden un dominio extracelular, que está asociado con la unión de ligandos y dominios cinasa intracelulares que median la autofosforilación, el reclutamiento de moléculas de señalización en el sentido de 3' que desencadenan un cascada de acontecimientos de transducción de señales. Existen más de 30 RTK implicadas en el cáncer, por ejemplo las RTK de tipo III (PDGFR, CSF-1R, FLT3 y c-KIT), tipo IV (FGFR1-4) y tipo V (VEGFR1-3).

50 El mieloma múltiple (MM), una enfermedad de células B malignas, se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas clonales en la médula ósea (MO) y lesiones óseas osteolíticas. El trasplante de células madres autólogas (ASCT) y los avances en el cuidado de apoyo han tenido un impacto significativo en la enfermedad y supervivencia a largo plazo. Attal, M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 1996; 335:91-97; y Barlogie, B. *et al.*, *Blood*, 1997;

89:789-793. Sin embargo, los pacientes experimentan recaída de manera invariable, y MM sigue siendo una enfermedad mortal universal. La identificación de translocaciones cromosómicas no aleatorias en MM ha dado como resultado el desarrollo de potentes herramientas de pronóstico y la identificación de dianas moleculares nuevas. Casi la mitad de los pacientes con MM sobreexpresan un supuesto oncogén, desregulado por una de las cinco translocaciones de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) recurrentes: 11 q13 (ciclina D1), 6p21 (ciclina D3), 4p16 (FGFR3 y MMSET), 16q23 (c-maf) y 20q11 (mafB). Kuehl, W. M. *et al.*, *Nat Rev Cancer*, 2002; 2:175-187; y Avet-Loiseau, H. *et al.*, *Blood*, 2002; 99:2185-2191. Estas translocaciones probablemente representan un acontecimiento temprano y posiblemente fundamental en el desarrollo de MM. Más recientemente, se ha esclarecido que estas translocaciones de IgH específicas confieren importancia en el pronóstico. Particularmente, la translocación t(4;14) que se produce en aproximadamente el 15% de los pacientes parece conferir un pronóstico particularmente malo para MM, sin ningún beneficio terapéutico aparente de ASCT. Fonseca, R. *et al.*, *Blood*, 2003; 101:4569-4575; Keats, J. J. *et al.*, *Blood*, 2003; 101:1520-1529; Moreau, P. *et al.*, *Blood*, 2002; 100:1579-1583; y Chang, H. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 2004; 125:64-68. Claramente, se requieren enfoques de tratamiento novedosos para estos pacientes.

La translocación t(4;14) es inusual porque parece desregular dos posibles oncogenes, MMSET en der (4) y FGFR3 en der(14). Chesi, M. *et al.*, *Nat. Genet.*, 1997; 16:260-265; y Chesi, M. *et al.*, *Blood*, 1998; 92: 3025-3034. No se sabe si la desregulación de cualquiera o ambos de estos genes es crítica para la patogénesis de MM, sin embargo varias líneas de razonamiento respaldan un papel para FGFR3 en la iniciación y progresión del tumor. La activación de FGFR3 WT, una RTK, promueve la proliferación y supervivencia en células de mieloma y se transforma débilmente en un modelo de ratón hematopoyético. Plowright, E. E. *et al.*, *Blood*, 2000; 95:992-998; Chesi, M. *et al.*, *Blood*, 2001; 97:729-736; y Pollett, J. B. *et al.*, *Blood*, 2002; 100:3819-3821. La posterior adquisición de mutaciones activantes de FGFR3 en algunos MM está asociada con la progresión a mieloma de estadio tardío y se transforman fuertemente en varios modelos experimentales. Chesi, M. *et al.*, *Blood*, 2001; 97:729-736; y Li, Z. *et al.*, *Blood*, 2001; 97:2413-2419. Estudios *in vitro* sugieren que FGFR3 puede conferir quimiorresistencia, una observación respaldada por datos clínicos que demuestran escasas respuestas a la quimioterapia convencional y una mediana de la supervivencia reducida de pacientes con MM con t(4;14). Fonseca, R. *et al.*, *Blood*, 2003; 101:4569-4575; Keats, J. J. *et al.*, *Blood*, 2003; 101:1520-1529; Moreau, P. *et al.*, *Blood*, 2002; 100:1579-1583; y Chang, H. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 2004; 125:64-68. Estos hallazgos sugieren que la expresión ectópica de FGFR3 puede desempeñar un papel significativo, aunque no singular, en la oncogénesis del mieloma haciendo así que esta RTK sea una diana para terapia de base molecular.

La inhibición de FGFR3 en líneas celulares de MM con t(4;14) induce respuestas citotóxicas demostrando que estas células siguen dependiendo de la señalización de FGFR3 a pesar de la complejidad de las alteraciones genéticas en estas células derivadas de pacientes en fase terminal. Trudel, S. *et al.*, *Blood*, 2004; 103:3521-3528; Paterson, J. L. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 2004; 124:595-603; y Grand, E. K. *et al.*, *Leukemia*, 2004; 18:962-966. Estas observaciones son congruentes con los resultados de la inactivación tirosinas receptoras en una gama de tumores malignos humanos en los que se han documentado éxitos clínicos y se ha alentado el desarrollo clínico de inhibidores de FGFR3 para el tratamiento de estos pacientes con mal pronóstico. Druker, B. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 2001; 344:1031-1037; Demetri, G. D. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 2002; 347:472-480; Slamon, D. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2001; 344:783-792; y Smith, B. D. *et al.*, *Blood*, 2004; 103:3669-3676.

La leucemia mielógena aguda (LMA) es un cáncer agresivo y representa el 90% de todas las leucemias agudas de adulto con una incidencia de 3,9 por cada 100.000 y 10.500 nuevos casos estimados cada año. Redaelli, A. *et al.*, *Exper. Rev. Anticancer. Ther.*, 3:695-710 (2003). Los agentes citotóxicos (AraC + antraciclina) pueden inducir remisión hasta en el 70% de pacientes con LMA. Sin embargo, una gran fracción experimentalmente recaída reflejando la necesidad de terapias más eficaces. Weick, J.K. *et al.*, *Blood*, 88: 2841-2851 (1996); Vogler, W.R. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 10:1103-1111 (1992). La genotipificación de células tumorales indica que el 25-35% de blastocitos de LMA portan mutaciones de tirosina cinasa de tipo fms (flt3/Fik2/Stk-2), mientras que una fracción mayor (>70%) expresa FLT3 de tipo natural. Gilliland, D.G. *et al.*, *Curr. Opin. Hematol.*, 9:274-281 (2002); Nakao, M. *et al.*, *Leukemia*, 10:1911-1918 (1996); Yokota, S. *et al.*, *Leukemia*, 11:1605-1609 (1997). El receptor de FLT3 es un miembro de las tirosinas cinasas receptoras (RTK) de clase III que incluye CSF-1R, c-KIT, PDGFR, y se sabe que funcionalmente desempeñan un papel importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de células hematopoyéticas, células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*) y células B progenitoras. McKenna, H.J. *et al.* *Blood*, 95:3489-3497 (2000); Mackaretschian, K. *et al.*, *Immunity*, 3:147-161 (1995). El FLT3, como otras RTK, se caracteriza por cinco dominios extracelulares de tipo IG y contiene un dominio de inserto de cinasa hidrófilo. Blume-Jensen, P. *et al.*, *Nature*, 411:355-365 (2001). La transducción de señales tras el ligamiento de FLT3 modula múltiples rutas en el sentido de 3', incluyendo STAT5 (transductor de señales y activador de la transcripción 5), Ras/MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) y PI3K. Hayakawa, F. *et al.*, *Oncogene*, 19:624-631 (2000); Takahashi, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316:85-92 (2004); Zhang, S. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 192:719-728 (2000); Rosnet, O. *et al.*, *Acta Haematol.*, 95: 218-223 (1996). En células con FLT3 mutante, se ha relacionado la señalización oncogénica con la activación constitutiva de cinasas (en ausencia de ligamiento de FLT3) que surge de la activación desregulada de cinasas y/o la pérdida de la función del dominio autoinhibidor. Stirewalt, D.L. *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 3:650-665 (2003); Brown, P. *et al.*, *Eur. J. Cancer*, 40:707-721 (2004). La caracterización molecular de estas mutaciones de FLT3 han revelado o bien duplicaciones internas en tándem (ITD) en la región

yuxtamembrana de FLT3 o bien mutaciones puntuales en el dominio cinasa (ASP835/836), siendo el 17-34% ITD de FLT3 y aproximadamente el 7% mutaciones puntuales. Yamamoto, Y. *et al.*, *Blood*, 97:2434-2439 (2001); Thiede, C., *et al.*, *Blood*, 99:4326-4335 (2002); Abu-Duhier, F.M. *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 113:983-988 (2001). Además, existen pruebas considerables que implican las mutaciones ITD de FLT3 como pronóstico negativo en LMA, que se correlaciona con un aumento de recaída de la enfermedad y una disminución de la supervivencia global. Thiede, C. *et al.*, *Blood*, 99:4326-4335 (2002); Schnittger, S. *et al.*, *Blood*, 100: 59-66 (2002). Dado la relevancia de las mutaciones de FLT3 en LMA, se están explorando actualmente varios enfoques dirigidos que utilizan inhibidores de cinasas de molécula pequeña/anticuerpos contra FLT3 en las fases tempranas o preclínicas del desarrollo de fármacos. Brown, P. *et al.*, *Eur. J. Cancer*, 40:707-721 (2004); O'Farrell, A.M. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 9:5464-5476 (2003); Weisberg, E., *et al.*, *Cancer Cell*, 1: 433-443 (2002); Smith, B.D. *et al.*, *Blood*, (2004); Kelly, I.M. *et al.*, *Cancer Cell*, 1:421-432 (2002).

En tumores de próstata, además del papel de VEGFR, y PDGFR en la angiogénesis, varios factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores (FGFR) aceleran la comunicación clave estroma-epitelio en el desarrollo y la homeostasis de la próstata humana. Griffioen, A.W. y Molema, G., "Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation", *Pharmacol. Rev.*, 52, págs. 237-68 (2000); Ferrara, N., "VEGF: an Update on Biological and Therapeutic Aspects", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, págs. 617-24 (2000); Kwabi-Addo, B., Ozen, M., e Ittmann, M., "The Role of Fibroblast Growth Factors and their Receptors in Prostate Cancer", *Endocr. Relat. Cancer*, 11, págs. 709-24 (2004); y Gowardhan, B., Douglas, D.A., Mathers, M.E., *et al.*, "Evaluation of the Fibroblast Growth Factor System as a Potential Target for Therapy in Human Prostate Cancer", *Br. J. Cancer*, 92, págs. 320-7 (2005). Se han implicado alteraciones en la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) en la patogénesis del cáncer de próstata. Ozen, M., Giri, D., Ropiquet, F., Mansukhani, A., e Ittmann, M., "Role of Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling in Prostate Cancer Cell Survival", *J. Natl. Cancer Inst.*, 93, págs. 1783-90 (2001). En muchos casos, el cáncer de próstata metastatiza preferentemente en el hueso, y por tanto, los pacientes corren un mayor riesgo de desarrollar complicaciones esqueléticas, y/o fracturas, que es una de las causas principales de morbilidad en pacientes con cáncer de próstata. Existe una necesidad de métodos de tratamiento del cáncer de próstata y de métodos de prevención de la metástasis del cáncer de próstata en el hueso en pacientes con cáncer de próstata.

Se han dado a conocer recientemente diversos compuestos sustituidos con indolilo en los documentos WO 01/29025, WO 01/62251 y WO 01/62252, y diversos compuestos de bencimidazolilo se han dado a conocer recientemente en el documento WO 01/28993. Estos compuestos supuestamente pueden inhibir, modular y/o regular la transducción de señales tanto de tirosina cinasas de tipo receptoras como no receptoras. Algunos de los compuestos dados a conocer contienen un fragmento de quinolona unido al grupo indolilo o bencimidazolilo.

Se da a conocer la síntesis de derivados de 4-hidroxiquinolona y 4-hidroxiquinolina en varias referencias que se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines tal como si se expusieran completamente en el presente documento. Por ejemplo, Ukrainets *et al.* dio a conocer la síntesis de 3-(bencimidazol-2-il)-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolina. Ukrainets, I. *et al.*, *Tet. Lett.* 42, 7747-7748 (1995); Ukrainets, I. *et al.*, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 2, 239-241(1992). Ukrainets también dio a conocer la síntesis, actividad antitiroidea y anticonvulsiva de otras 4-hidroxiquinolonas y análogos de tio tales como 1H-2-oxo-3-(2-bencimidazolil)-4-hidroxiquinolina. Ukrainets, I. *et al.*, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 1, 105-108 (1993); Ukrainets, I. *et al.*, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii*, 8, 1105-1108 (1993); Ukrainets, I. *et al.*, *Chem. Heterocyclic Comp.* 33, 600-604. (1997).

Se da a conocer la síntesis de diversos derivados de quinolina en el documento WO 97/48694. Estos compuestos se dan a conocer como capaces de unirse a los receptores nucleares de hormonas y que son útiles para estimular la proliferación de osteoblastos y el crecimiento óseo. Los compuestos también se dan a conocer como que son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con familias de receptores nucleares de hormonas.

Se dan a conocer diversos derivados de quinolina en los que el anillo de benceno de la quinolona está sustituido con un grupo de azufre en el documento WO 92/18483. Estos compuestos se dan a conocer como que son útiles en formulaciones farmacéuticas y como medicamentos.

Se han dado a conocer derivados de cumarina y quinolona como pueden usarse en una variedad de aplicaciones no relacionadas con la medicina y las formulaciones farmacéuticas. Referencias que describen la preparación de derivados de quinolona para su uso en composiciones fotopolimerizables o para propiedades luminiscentes incluyen: la patente estadounidense n.º 5.801.212 concedida a Okamoto *et al.*; los documentos JP 8-29973; JP 7-43896; JP 6-9952; JP 63-258903; EP 797376 y DE 23 63 459 que se incorporan todos al presente documento como referencia en su totalidad para todos los fines tal como si se expusieran completamente en el presente documento.

Se dan a conocer diversos compuestos de quinolona-bencimidazol útiles en la inhibición de la angiogénesis y tirosinas cinasas receptoras del factor de crecimiento endotelial vascular y en la inhibición de otras tirosina y serina/treonina cinasas incluyendo 4-amino-5-fluoro-3-[5-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-

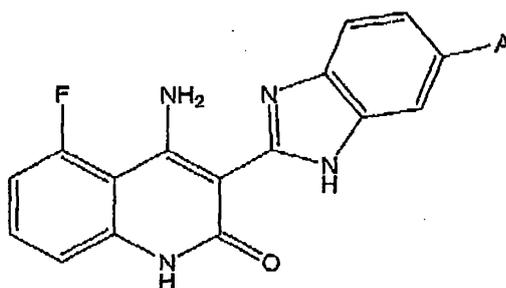
ona o un tautómero de los mismos en los siguientes documentos: la patente estadounidense n.º 6.605.617; la patente estadounidense n.º 6.756.383; la solicitud de patente estadounidense n.º 10/116.117 presentada (publicada el 6 de febrero de 2003, como el documento US 2003/0028018 A1); la solicitud de patente estadounidense n.º 10/644.055 (publicada el 13 de mayo de 2004, solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0092535); la solicitud de patente estadounidense n.º 10/983.174; la solicitud de patente estadounidense n.º 10/706.328 (publicada el 4 de noviembre de 2004, como el documento 2004/0220196); la solicitud de patente estadounidense n.º 10/982.757; la solicitud de patente estadounidense n.º 10/982.543; y el documento WO 2005/082340.

A pesar de los recientes avances en los métodos para tratar tumores y cáncer, todavía existe una necesidad importante de nuevos métodos para tratar el cáncer y especialmente de nuevos métodos y composiciones para tratar el cáncer metastásico tal como tumores metastatizados. Se requieren además métodos para tratar mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda y cáncer de próstata.

Sumario de la invención

La invención proporciona el uso de compuestos, tautómeros de los mismos, sales de los mismos, y mezclas de los mismos en el uso de formulaciones farmacéuticas y medicamentos para tratar el cáncer metastásico.

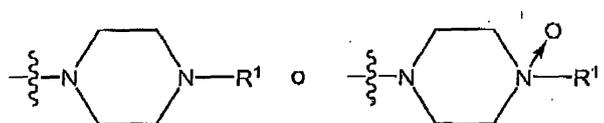
En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de compuestos en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer metastásico en un sujeto, tal como un paciente humano con cáncer. El uso incluye administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de estructura I, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos. La estructura I tiene la siguiente fórmula:



I

en la que,

A es un grupo que tiene una de las siguientes estructuras:

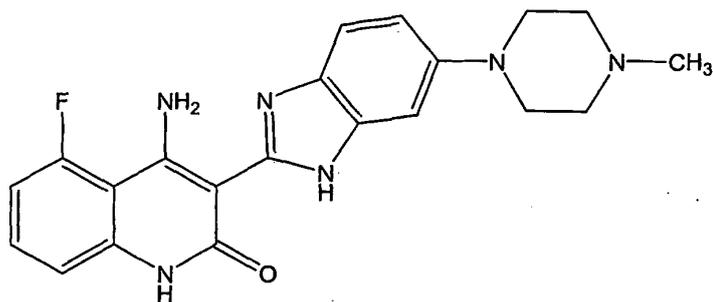


en las que,

R¹ se selecciona de H o grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

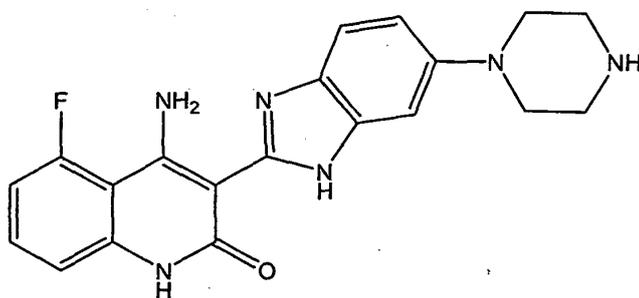
En diversas realizaciones del uso de la invención, se inhibe el crecimiento del cáncer o los tumores metastatizados (en el sujeto) tras la administración.

En algunas realizaciones, R¹ es un grupo metilo, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IA



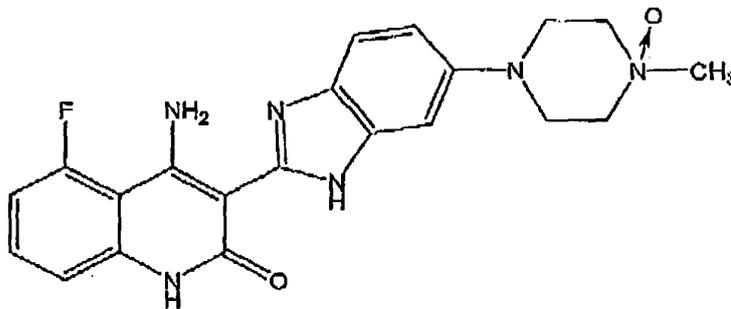
IA

En algunas realizaciones, R¹ es un hidrógeno, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IB



IB

En algunas realizaciones, R¹ es un grupo metilo, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IC



IC

5

En algunas realizaciones, el compuesto se administra sistémicamente, más particularmente el compuesto de estructura I se administra por vía oral o por vía intravenosa.

10 En algunas realizaciones, se administra un segundo agente al sujeto. Más particularmente, el segundo agente es para el tratamiento de la osteoporosis, tal como un bisfosfonato. En otras realizaciones, el segundo agente es un agente anticancerígeno.

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de estructura I, IA, IB o IC, y se administra la sal de lactato del compuesto o el tautómero al sujeto.

En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple y el sujeto es un paciente con mieloma múltiple con una translocación cromosómica t(4;14). Más particularmente, el tumor es un tumor hematológico.

15 En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple, el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el mieloma múltiple expresa el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos.

En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple, el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el mieloma múltiple ha metastatizado en un hueso del paciente tal como en la médula ósea.

En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple, el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el paciente es un ser humano.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto de estructura I, IA, IB y/o IC, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos en la preparación de un medicamento o una formulación farmacéutica para su uso en cualquiera de las realizaciones de la invención.

- 10 Resultarán evidentes objetos, características y ventajas adicionales de la invención a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra que ratones SCID-beige a los que se les inyectó células KMS-11-luc y se trataron con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (20 mg/kg/d) mostraron un recuento medio de fotonos significativamente menor que los tratados con vehículo.

- 15 Las figuras 2 a 5 son gráficos que muestran la actividad antitumoral de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de tumores leucémicos MV4;11 o RS4;11 humanos en ratones SCID-NOD. Se implantaron por vía s.c. células MV4;11 (figura 2) o RS4;11 (figura 3) en el costado derecho de ratones SCID-NOD (n= 10 ratones/grupo). En estudios de MV4;11, se administró por vía oral vehículo (◇) o compuesto 1 a dosis de 1 (●), 5 (▲), o 30 (■) mg/kg/d durante 15 días cuando
20 los tumores eran - 300 mm³. En estudios de RS4;1, se administró por vía oral vehículo (◇) o compuesto 1 a dosis de 10 (▲), 30 (■), 100 (◆) o 150 (●) mg/kg/d durante 8 días cuando los tumores eran - 300 mm³. (Figura 4) Efecto de los regímenes de dosificación diaria, intermitente y cíclica de compuesto 1 sobre la eficacia de los tumores MV4;11. Se administró por vía oral compuesto 1 a una dosis de 30 mg/kg o bien diariamente (■), cada dos días/q.o.d. (●) o bien de forma cíclica 7 días sí/7 días no (X). (Figura 5) el compuesto 1 induce la regresión de tumores MV4;11
25 grandes. Se clasificaron los tumores MV4;11 s.c. (n=10 ratones/grupo) en 300 (▲), 500 (■) o 1000 (●) mm³. Se expresan los datos como volumen tumoral medio ± EE (n = 10 ratones/grupo).

- La figura 6 es un gráfico que muestra que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) prolonga la supervivencia de ratones SCID-NOD que portaban células MV4;11 intravenosas. Se les implantó a ratones SCID-NOD irradiados, MV4;11 (1 x 10⁷ células, i.v.) por vía i.v. Se iniciaron los tratamientos en el día 23, consistiendo en o bien vehículo por vía oral (◆) o bien compuesto 1 20 mg/kg
30 administrado diariamente (▲) o programado 7 días sí/7 días no (■) desde los días 23 - 98. Se sacrificaron los ratones en los que se suscitaban signos tempranos de parálisis de las extremidades posteriores o mal estado de salud. La figura 6 ilustra representaciones gráficas de Kaplan-Meier del porcentaje de supervivencia frente al tiempo (n= 10-12 ratones/grupo).

- 35 La figura 7 incluye gráficos que muestran recuentos de fotonos individuales (a escala logarítmica) generados a partir de las zonas abdominales, de la cabeza y las patas de ratones atómicos a los que se les inyectaron células PC-3M-luc y entonces se trataron con vehículo, taxol o compuesto 1. Los gráficos muestran que el tratamiento con compuesto 1 (154258) demostró una tendencia a inhibir los recuentos de fotonos de PC-3M-luc e inhibe el crecimiento de células PC-3M-luc que se han diseminado en el hueso.

- 40 La figura 8 es un gráfico del volumen tumoral frente al día de tratamiento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de compuestos en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer metastásico, particularmente mieloma múltiple metastatizado.

Se usan las siguientes abreviaturas y definiciones en toda esta solicitud:

- 45 "LMA" es una abreviatura que significa leucemia mielógena aguda.

"ELA" es una abreviatura que significa esclerosis lateral amiotrófica.

“EA” es una abreviatura que significa enfermedad de Alzheimer.

“PPA” es una abreviatura que significa proteína precursora de amiloide.

“ASCT” es una abreviatura que significa trasplante de células madres autólogas.

“MO” es una abreviatura que significa médula ósea.

5 “bFGF” es una abreviatura que significa factor de crecimiento de fibroblastos básico.

“FGFR1”, también denominada bFGFR, es una abreviatura que significa una tirosina cinasa que interacciona con el factor de crecimiento de fibroblastos FGF.

“Cdc 2” es una abreviatura que significa ciclo de división celular 2.

“Cdk 2” es una abreviatura que significa cinasa dependiente de ciclina 2.

10 “Cdk 4” es una abreviatura que significa cinasa dependiente de ciclina 4.

“Chk 1” es una abreviatura que significa cinasa de punto de control 1.

“CK1 ϵ ” es una serina/treonina cinasa que significa caseína cinasa 1 (épsilon).

“c-ABL” es una abreviatura para una tirosina cinasa que significa un producto oncogénico aislado originariamente del virus de la leucemia de Abelson.

15 “C-Kit” también se conoce como receptor del factor de células madre o receptor del factor de crecimiento de mastocitos.

“FGF” es una abreviatura para el factor de crecimiento de fibroblastos que interacciona con FGFR1.

“FGFR3” es una abreviatura que significa el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos de tirosina cinasa que a menudo se expresa en cánceres de tipo mieloma múltiple.

20 “Flk-1” es una abreviatura que significa tirosina cinasa de hígado fetal 1, también conocida como tirosina cinasa de dominio de inserto de cinasa o KDR (humana), también conocida como receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR2 (KDR (humana), Flk-1 (de ratón)).

“FLT-1” es una abreviatura que significa tirosina cinasa de tipo fms 1, también conocida como receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR1.

25 “FLT-3” es una abreviatura que significa tirosina cinasa de tipo fms 3, también conocida como tirosina cinasa de células madre I (STK I).

“FLT-4” es una abreviatura que significa tirosina cinasa de tipo fms 4, también conocida como VEGFR3.

“Fyn” es una abreviatura que significa cinasa oncogénica FYN relacionada con SRC, FGR, YES.

“GSK-3” es una abreviatura que significa glucógeno sintasa cinasa 3.

30 “PAR-1” es una abreviatura que significa una cinasa también conocida como cinasa asociada a *Disheveled*, también conocida como HDAK.

“Lck” es una abreviatura que significa proteína tirosina cinasa específica de linfocitos.

35 “MEK1” es una abreviatura que significa una serina-treonina cinasa en la ruta de transducción de señales MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) en un módulo que está formado por Raf-MEK1-ERK. MEK1 fosforilan ERK (cinasa regulada extracelular).

“MM” es una abreviatura que significa mieloma múltiple.

“NEK-2” es una abreviatura que significa cinasa relacionada con NIM-A.

“NIM-A” es una abreviatura que significa nunca en mitosis.

“PDGF” es una abreviatura que significa factor de crecimiento derivado de plaquetas. El PDGF interacciona con las tirosina cinasas PDGFR α y PDGFR β .

5 “Rsk2” es una abreviatura que significa cinasa S6 ribosómica 2.

“Raf” es una serina/treonina cinasa en la ruta de transducción de señales MAPK.

“RTK” es una abreviatura que significa tirosina cinasa receptora.

“Tie-2” es una abreviatura que significa tirosina cinasa con dominios de homología de EGF e Ig.

“VEGF” es una abreviatura que significa factor de crecimiento endotelial vascular.

10 “VEGF-RTK” es una abreviatura que significa tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento endotelial vascular.

La expresión “metástasis” se refiere a la diseminación de células cancerosas desde un tumor a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas se diseminan generalmente de manera sistémica mediante el sistema linfático o el torrente sanguíneo.

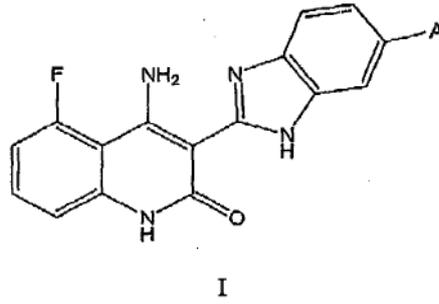
15 La inhibición del crecimiento de un tumor metastatizado pretende indicar una inhibición directa del crecimiento tumoral y/o la inhibición sistémica de células cancerosas que se han originado a partir del tumor.

Generalmente, la referencia a un determinado elemento tal como hidrógeno o H pretende incluir todos los isótopos de ese elemento. Por ejemplo, si no se incluye un grupo en el compuesto de estructura I o se muestra como H, entonces se define que incluye hidrógeno o H, deuterio y tritio.

20 La expresión “grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono” se refiere a grupos alquilo que no contienen heteroátomos e incluyen de 1 a 6 átomos de carbono. Por tanto, la expresión incluye grupos alquilo de cadena lineal tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, y similares. La expresión también incluye isómeros de cadena ramificada de grupos alquilo de cadena lineal, incluyendo pero sin limitarse a, los siguientes que se proporcionan a modo de ejemplo: -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH(CH₂CH₃)₂,
 25 -C(CH₃)₃, -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH(CH₂CH₃)₂, -CH₂C(CH₃)₃, -CH(CH₃)CH(CH₃)(CH₂CH₃),
 30 -CH₂CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₂CH(CH₃)(CH₂CH₃), -CH₂CH₂C(CH₃)₃, -CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂, y otros. En algunas realizaciones, los grupos alquilo incluyen grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 6 átomos de carbono. En otras realizaciones, los grupos alquilo tienen desde 1 hasta 4 átomos de carbono. Todavía en otras realizaciones, el grupo alquilo es un grupo alquilo de cadena lineal que tiene de 1 a 2 átomos de carbono (grupo metilo o etilo). Todavía en otras realizaciones, el grupo alquilo tiene sólo 1 átomo de carbono y es un grupo metilo (-CH₃).

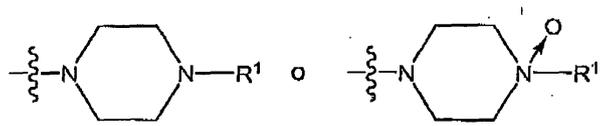
Una “sal farmacéuticamente aceptable” incluye una sal con una base inorgánica, base orgánica, ácido inorgánico, ácido orgánico, o aminoácido básico o ácido. Como sales de bases inorgánicas, la invención incluye, por ejemplo, metales alcalinos tales como sodio o potasio; metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio o aluminio; y amoniaco. Como sales de bases orgánicas, la invención incluye, por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina. Como sales de ácidos inorgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido borhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Como sales de ácidos orgánicos, la presente invención incluye, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico. Como sales de aminoácidos básicos, la presente invención incluye, por ejemplo, arginina, lisina y ornitina. Los aminoácidos ácidos incluyen, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de compuestos en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer metastásico en un sujeto, tal como un paciente humano con cáncer. El uso incluye administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de un compuesto de estructura I, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos. La estructura I tiene la siguiente fórmula:



en la que,

A es un grupo que tiene una de las siguientes estructuras:

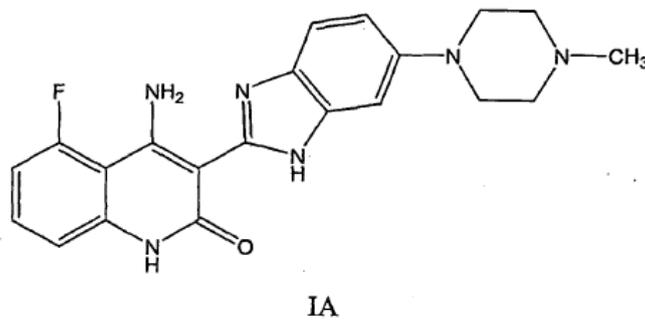


5 en las que,

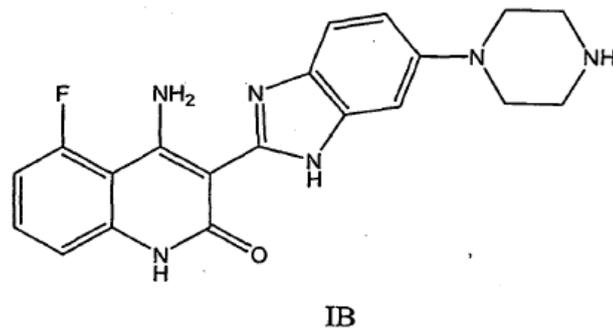
R¹ se selecciona de H o grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, y

10 En algunas realizaciones, se inhibe el crecimiento del cáncer o los tumores metastatizados tras la administración del compuesto de estructura I, el tautómero del compuesto, la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, la sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o la mezcla de los mismos.

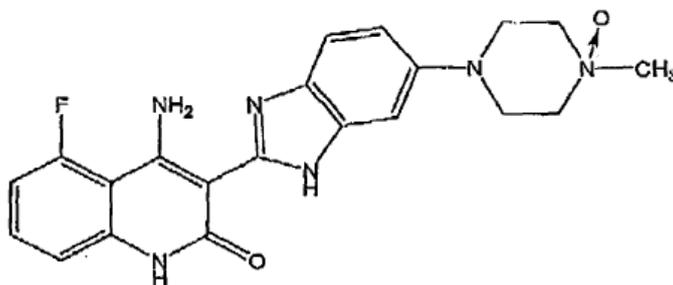
En algunas realizaciones, R¹ es un grupo metilo, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IA



En algunas realizaciones, R¹ es un hidrógeno, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IB



En algunas realizaciones, R¹ es un grupo metilo, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IC



IC

En algunas realizaciones, se administra el compuesto sistémicamente. Más particularmente, se administra el compuesto de estructura I por vía oral o por vía intravenosa.

- 5 En algunas realizaciones, se administra un segundo agente al sujeto. Más particularmente, el segundo agente es para el tratamiento de la osteoporosis, tales como un bisfosfonato. En otras realizaciones, el segundo agente es un agente anticancerígeno.

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de estructura I, IA, IB o IC, y se administra la sal de lactato del compuesto o el tautómero al sujeto.

- 10 En algunas realizaciones, se amplía la tasa de supervivencia en el sujeto tras la administración del compuesto de estructura I, el tautómero del compuesto, la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, la sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o la mezcla de los mismos.

Los tumores metastatizados que pueden tratarse según la invención son mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple y el sujeto es un paciente con mieloma múltiple con una translocación cromosómica t(4;14).

- 15 En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple, el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el mieloma múltiple expresa el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos.

En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple, el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el mieloma múltiple ha metastatizado en un hueso del paciente tal como en la médula ósea del paciente. Debido a que los compuestos de la invención se concentran en el hueso, son particularmente útiles y eficaces en el tratamiento de tumores hematológicos metastatizados.

- 20 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar un paciente que tiene un cáncer que ha metastatizado en el hueso. Dichos cánceres pueden ser tumores sólidos o hematológicos. En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar un paciente que tiene un cáncer que ha metastatizado en el hueso. Dichos cánceres pueden ser tumores sólidos o hematológicos. En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple.

- 25 En algunas realizaciones, el tumor es mieloma múltiple, el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el paciente es un ser humano.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto de estructura I, IA, IB y/o IC, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos en la preparación de un medicamento o una formulación farmacéutica para su uso en cualquiera de las realizaciones de la invención.

- 30

Los compuestos de estructura I se sintetizan rápidamente usando los procedimientos descritos en la siguiente sección de ejemplos y se dan a conocer en los siguientes documentos: la patente estadounidense n.º 6.605.617, la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2004/0092535, la solicitud de patente estadounidense n.º 10/983.174, la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2004/0220196, la solicitud de patente estadounidense n.º 10/982.757, y la solicitud de patente estadounidense n.º 10/982.543.

- 35

Pueden usarse los compuestos de estructura I, tautómeros de los compuestos, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos, sales farmacéuticamente aceptables de los tautómeros, y mezclas de los mismos para preparar medicamentos, que pueden usarse para los fines descritos en el presente documento, y pueden usarse para tratar

diversos estados biológicos tal como se describe en el presente documento.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir cualquiera de los compuestos, tautómeros o sales de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como los descritos en el presente documento.

5 La presente invención también proporciona composiciones que pueden prepararse mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o tautómeros de las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, o mezclas de los mismos con portadores, excipientes, aglutinantes, diluyentes farmacéuticamente aceptables o similares para tratar o mejorar enfermedades relacionadas con tumores metastatizados. Las composiciones de las
10 invenciones pueden usarse para crear formulaciones usadas para tratar tumores metastatizados tal como se describe en el presente documento. Tales composiciones pueden estar en forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o disoluciones. Las presentes composiciones pueden formularse por diversas vías de administración, por ejemplo, mediante administración oral, mediante administración nasal, mediante administración rectal, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyecciones intramusculares o inyección intraperitoneal. Las siguientes formas farmacéuticas se dan a
15 modo de ejemplo y no debe considerarse que limitan la presente invención.

Para la administración oral, bucal y sublingual, polvos, suspensiones, gránulos, comprimidos, pastillas, cápsulas, cápsulas de gel y comprimidos oblongos son aceptables como formas farmacéuticas sólidas. Éstos pueden prepararse, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de la presente invención, sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros, o mezclas de los mismos, con al menos un aditivo tal como un almidón u otro aditivo.
20 Aditivos adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábica, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, glicéridos o polímeros sintéticos o semisintéticos. Opcionalmente, las formas farmacéuticas orales pueden contener otros componentes para ayudar en su administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio, o conservantes tales como parabeno o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico,
25 tocoferol o cisteína, un agente disgregante, aglutinantes, espesantes, tampones, edulcorantes, agentes aromatizantes o agentes perfumantes. Los comprimidos y las pastillas pueden tratarse adicionalmente con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden estar en forma de emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones y disoluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inactivo, tal
30 como agua. Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas y medicamentos como suspensiones o disoluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como, pero sin limitarse a, un aceite, agua, un alcohol, y combinaciones de éstos. Pueden añadirse tensioactivos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables para la administración oral o parenteral.

Tal como se observó anteriormente, las suspensiones pueden incluir aceites. Tal aceite incluye, pero no se limita a, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. La preparación en suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones en suspensión pueden incluir alcoholes, tales como, pero sin limitarse a, etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadecílico, glicerol y propilenglicol. También pueden usarse éteres, tales como pero sin limitarse a, poli(etilenglicol), hidrocarburos de
40 petróleo tales como aceite mineral y petrolato; y agua en las formulaciones en suspensión.

Para la administración nasal, las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos pueden ser una pulverización o aerosol que contiene un(os) disolvente(es) apropiado(s) y opcionalmente otros compuestos tales como, pero sin limitarse a, estabilizadores, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos. Un propelente para una formulación en aerosol
45 puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono, o un disolvente de bajo punto de ebullición basado en hidrocarburo.

Las formas farmacéuticas inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones oleosas que pueden prepararse usando un agente humectante o dispersante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de disolución o en forma de una suspensión, que se prepara con un disolvente o
50 diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, disolución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, pueden emplearse aceites estériles como disolventes o agentes de suspensión. Preferiblemente, el aceite o ácido graso no es volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono-, di- o tri-glicéridos.

Para inyección, la formulación farmacéutica y/o el medicamento puede ser un polvo adecuado para su reconstitución con una disolución apropiada tal como se describió anteriormente. Los ejemplos de éstos incluyen, pero no se limitan a, polvos liofilizados, secados de manera giratoria o secados por pulverización, polvos amorfos, gránulos,
55

precipitados o particulados. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de éstos.

5 Para la administración rectal, las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos pueden estar en forma de un supositorio, una pomada, un enema, un comprimido o una crema para la liberación del compuesto en los intestinos, el ángulo sigmoide y/o el recto. Los supositorios rectales se preparan mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros farmacéuticamente aceptables del compuesto, con vehículos aceptables, por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicol, que está presente en una fase sólida a temperaturas de almacenamiento normales, y presente en una fase líquida a las temperaturas adecuadas para liberar un fármaco en el interior del organismo, tal como en el recto. También pueden emplearse aceites en la preparación de formulaciones del tipo de gelatina blanda y supositorios. Pueden emplearse agua, solución salina, disoluciones acuosas de dextrosa y azúcares relacionadas, y glicerol en la preparación de formulaciones en suspensión que también pueden contener agentes de suspensión tales como pectinas, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o carboximetilcelulosa, así como tampones y conservantes.

15 Además de las formas farmacéuticas representativas descritas anteriormente, los expertos en la técnica conocen generalmente excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables y, por tanto, están incluidos en la presente invención. Dichos excipientes y portadores se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991), que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad para todos los fines tal como si se expusiera completamente en el presente documento.

20 Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para ser de acción rápida, de liberación rápida, de acción prolongada y de liberación sostenida tal como se describe a continuación. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para liberación controlada o para liberación lenta.

25 Las presentes composiciones también pueden comprender, por ejemplo, micelas o liposomas, o algunas otras formas encapsuladas, o pueden administrarse en una forma de liberación extendida para proporcionar un efecto de administración y/o almacenamiento prolongado. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos pueden comprimirse para dar pastillas o cilindros y pueden implantarse por vía intramuscular o subcutánea como inyecciones de depósito o como implantes tales como endoprótesis. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

30 Pueden ajustarse dosificaciones específicas dependiendo del estado patológico, la edad, el peso corporal, el estado de la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, intervalos de dosis, vías de administración, tasa de excreción, y combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas farmacéuticas anteriores que contienen cantidades eficaces están dentro de los límites de la experimentación rutinaria y por tanto, muy dentro del alcance de la presente invención.

35 Una dosis terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la vía de administración y la forma farmacéutica. El compuesto o compuestos preferidos de la presente invención es una formulación que presenta un alto índice terapéutico. El índice terapéutico es la razón de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos que puede expresarse como la razón entre DL_{50} y DE_{50} . La DL_{50} es la dosis letal para el 50% de la población y la DE_{50} es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población. La DL_{50} y la DE_{50} se determinan mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células animales o animales de experimentación.

40 "Tratar" dentro del contexto de la presente invención, significa un alivio de los síntomas asociados con un trastorno o enfermedad, o detener la progresión adicional o empeoramiento de esos síntomas, o la prevención o profilaxis de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, dentro del contexto de tratamiento de pacientes con un tumor metastatizado, un tratamiento satisfactorio puede incluir una reducción en la proliferación de capilares que alimentan el(los) tumor(es) o el tejido afectado, un alivio de síntomas relacionados con un tumor o crecimiento canceroso, la proliferación de capilares, o tejido afectado, una detención en la proliferación de capilares, o una detención en la progresión de una enfermedad tal como cáncer o en el crecimiento de células cancerosas. El tratamiento también puede incluir administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención en combinación con otras terapias. Por ejemplo, los compuestos y las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse antes, durante o después de una intervención quirúrgica y/o radioterapia. Los compuestos de la invención también pueden administrarse junto con otros fármacos anticancerígenos incluyendo los usados en terapia génica y antisentido. Los expertos en las técnicas de la medicina y la oncología pueden determinar combinaciones apropiadas.

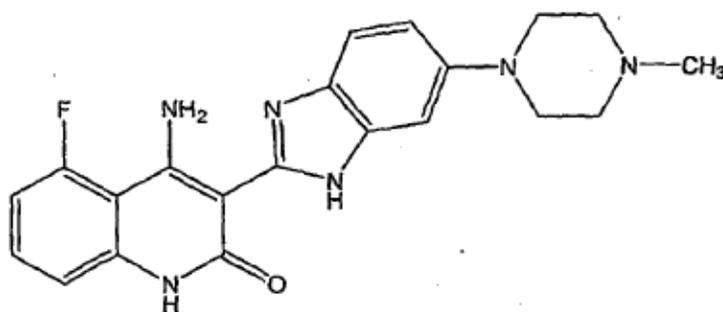
55 Las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos según la invención incluyen el compuesto de estructura I o los tautómeros, sales, o mezclas de los mismos en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse para preparar medicamentos y formulaciones farmacéuticas. Tales medicamentos y formulaciones farmacéuticas pueden usarse en el método de tratamiento descrito en el presente documento.

Los compuestos y las formulaciones de la presente invención son particularmente adecuados para su uso en la terapia de combinación ya que han mostrado que presentan un efecto sinérgico cuando se usan en combinación con fármacos anticancerígenos tales como camptotecina, doxorubicina, cisplatino, irinotecán (CPT-11), agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa I y II, y tratamiento con radiación. Por tanto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que incluyen el compuesto de estructura I y tautómeros, sales y/o mezclas de los mismos en combinación con un fármaco anticancerígeno. La invención también proporciona el uso de los compuestos, tautómeros, sales y/o mezclas para crear tales formulaciones y medicamentos.

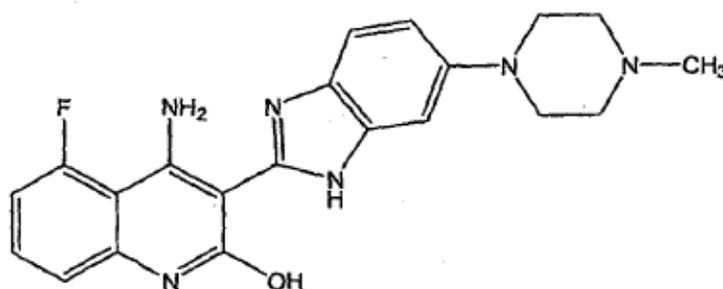
En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer metastásico administrando un compuesto de la presente invención y un fármaco anticancerígeno adicional. El método incluye administrar a un sujeto que lo necesite, un fármaco anticancerígeno seleccionado de mesilato de imatinib (Gleevec), BAY43-9006, brostalicina, lenalidomida (Revlimid), talidomida (Thalomid), docetaxel (Taxotere), erlotinib (Tarceva), vatalinib (PTK-787), VEGF-trap, fenretidina, bortezomib, bevacizumab (Avastin), pertuzumab y/o rituximab, y un compuesto de la invención, un tautómero del compuesto, una sal del compuesto, una sal del tautómero, una mezcla de los mismos, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el tautómero, la sal del compuesto, la sal del tautómero, o la mezcla.

Los compuestos de la invención pueden usarse para tratar una variedad de sujetos. Los sujetos adecuados incluyen animales tales como mamíferos y seres humanos. Los mamíferos adecuados incluyen, pero no se limitan a, primates tales como, pero sin limitarse a lémures, simios y monos; roedores tales como ratas, ratones y cobayas; conejos y liebres; vacas; caballos; cerdos; cabras; ovejas; marsupiales; y animales carnívoros tales como felinos, cánidos y úrsidos. En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto o paciente es un roedor tal como un ratón o una rata. En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es un animal diferente a un ser humano y en algunas de tales realizaciones, el sujeto o paciente es un mamífero diferente a un ser humano.

Debe entenderse que los compuestos usados en la invención pueden mostrar el fenómeno de tautomería. Dado que las estructuras químicas dentro de esta memoria descriptiva sólo pueden representar una de las posibles formas tautoméricas, debe entenderse que la invención abarca cualquier forma tautomérica de la estructura dibujada. Por ejemplo, la estructura IA se muestra a continuación con un tautómero, el tautómero Ia:

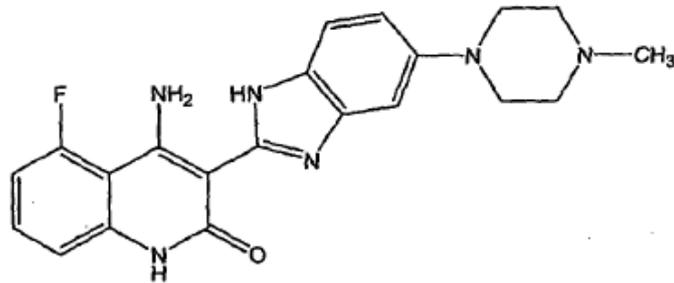


I

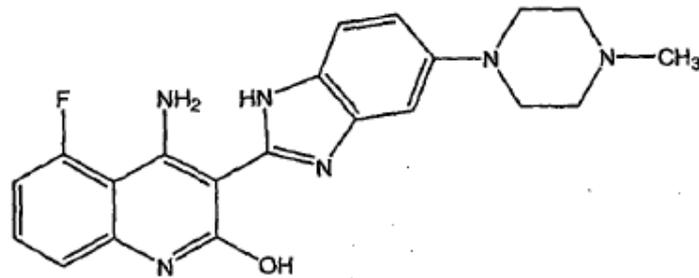


Ia

Otros tautómeros de estructura IA, el tautómero Ib y el tautómero Ic, se muestran a continuación:



Ib



Ic

- 5 La presente invención, descrita así generalmente, se entenderá más rápidamente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se usan en toda la solicitud con respecto a la terminología química:

- | | |
|-----------------------------|--|
| ATP: | Adenosina trifosfato |
| Boc: | N-terc-butoxicarbonilo |
| 10 BSA: | Albúmina sérica bovina |
| DMSO: | Dimetilsulfóxido |
| DTT: | DL-Ditiotreitol |
| DE ₅₀ : | Dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población |
| EDTA: | Ácido etilendiaminotetraacético |
| 15 EtOH: | Etanol |
| HPLC: | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| Valor de Cl ₅₀ : | La concentración de un inhibidor que provoca una reducción del 50 % en una actividad medida. |
| KHMDS: | Bis(trimetilsilil)amiduro de potasio |
| CL/EM: | Cromatografía de líquidos/espectroscopía de masas |

THF: Tetrahidrofurano

Purificación y caracterización de los compuestos

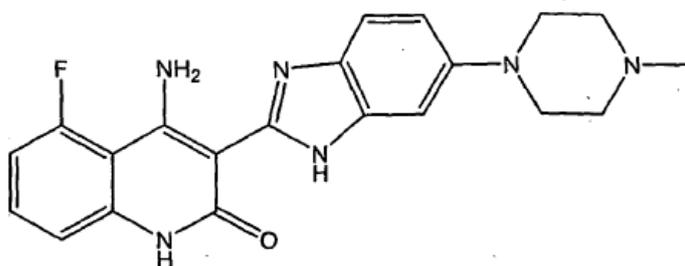
Se caracterizaron los compuestos de la presente invención mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) usando un sistema de cromatografía de Waters Millenium con un módulo de separación 2690 (Milford, Massachusetts). Las columnas analíticas eran Alltima C-18 de fase inversa, de 4,6 x 250 mm de Alltech (Deerfield, Illinois). Se usó una elución en gradiente, partiendo normalmente del 5% de acetonitrilo/95% de agua y avanzando hasta el 100% de acetonitrilo a lo largo de un periodo de 40 minutos. Todos los disolventes contenían ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Se detectaron los compuestos mediante absorción con luz ultravioleta (UV) o bien a 220 o bien a 254 nm. Los disolventes para HPLC eran de Burdick and Jackson (Muskegan, Michigan), o Fisher Scientific (Pittsburg, Pennsylvania). En algunos casos, se evaluó la pureza mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando placas de gel de sílice con fondo de plástico o vidrio, tales como, por ejemplo, láminas flexibles B2-F de gel de sílice 1 Baker-Flex. Se detectaron rápidamente los resultados de CCF visualmente bajo luz ultravioleta, o empleando técnicas de tinción con vapor de yoduro y otras diversas técnicas bien conocidas.

Se realizó el análisis de espectrometría de masas en uno de los dos instrumentos de CL-EM: un sistema Waters (HPLC Alliance HT y un espectrómetro de masas Micromass ZQ; columna: Eclipse XDB-C18, de 2,1 x 50 mm; sistema de disolventes: el 5-95% de acetonitrilo en agua con TFA al 0,05%; velocidad de flujo 0,8 ml/minuto; intervalo de peso molecular 150-850; tensión de cono 20 V; temperatura de columna 40°C) o un sistema Hewlett Packard (HPLC serie 1100; columna: Eclipse XDB-C18, de 2,1 x 50 mm; sistema de disolventes: el 1-95% de acetonitrilo en agua con TFA al 0,05%; velocidad de flujo 0,4 ml/minuto; intervalo de peso molecular 150-850; tensión de cono 50 V; temperatura de columna 30°C). Se notifican todas las masas como las de los iones originales protonados.

Se realizó el análisis de CG-EM en un instrumento Hewlett Packard (cromatógrafo de gases serie HP6890 con un detector de masas selectivo 5973; volumen del inyector: 1 µl; temperatura inicial de columna: 50°C; temperatura final de columna: 250°C; tiempo de rampa: 20 minutos; velocidad de flujo de gas: 1 ml/minuto; columna: 5% de fenilmetilsiloxano, modelo n.º HP 190915-443, dimensiones: 30,0 m x 25 µm x 0,25 µm).

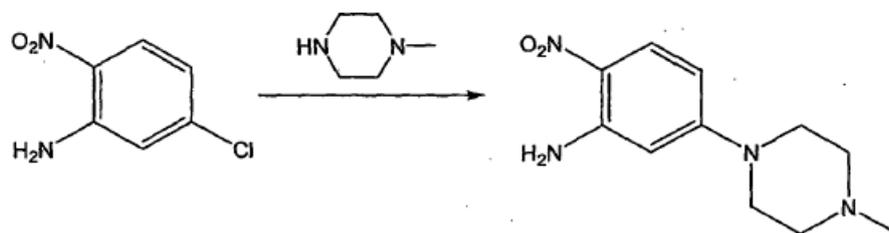
Se llevaron a cabo separaciones preparativas usando o bien un sistema de cromatografía Flash 40 y KP-Sil, 60A (Biotage, Charlottesville, Virginia), o bien mediante HPLC usando a columna de fase inversa C-18. Disolventes típicos empleados para el sistema Flash 40 Biotage fueron diclorometano, metanol, acetato de etilo, hexano y trietilamina. Disolventes típicos empleados para la HPLC de fase inversa fueron concentraciones variables de acetonitrilo y agua con ácido trifluoroacético al 0,1%.

Síntesis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona



A. Síntesis de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina

Procedimiento A



Se pusieron 5-cloro-2-nitroanilina (500 g, 2,898 moles) y 1-metil-piperazina (871 g, 8,693 moles) en un matraz de 2000 ml equipado con un condensador y se purgaron con N₂. Se puso el matraz en un baño de aceite a 100°C y se calentó hasta que reaccionó por completo la 5-cloro-2-nitroanilina (normalmente durante la noche) tal como se determinó mediante HPLC. Después que la HPLC confirmó la desaparición de la 5-cloro-2-nitroanilina, se vertió la mezcla de reacción directamente (todavía caliente) en 2500 ml de agua a temperatura ambiente con agitación mecánica. Se agitó la mezcla resultante hasta que alcanzó la temperatura ambiente y entonces se filtró. Se añadió el sólido de color amarillo así obtenido a 1000 ml de agua y se agitó durante 30 minutos. Se filtró la mezcla resultante, y se lavó el sólido resultante con TBME (500 ml, 2X) y entonces se secó a vacío durante una hora usando un dique de caucho. Se transfirió el sólido resultante a una bandeja de secado y se secó en un horno de vacío a 50°C hasta peso constante proporcionando 670 g (97,8%) del compuesto del título como un polvo de color amarillo.

Procedimiento B

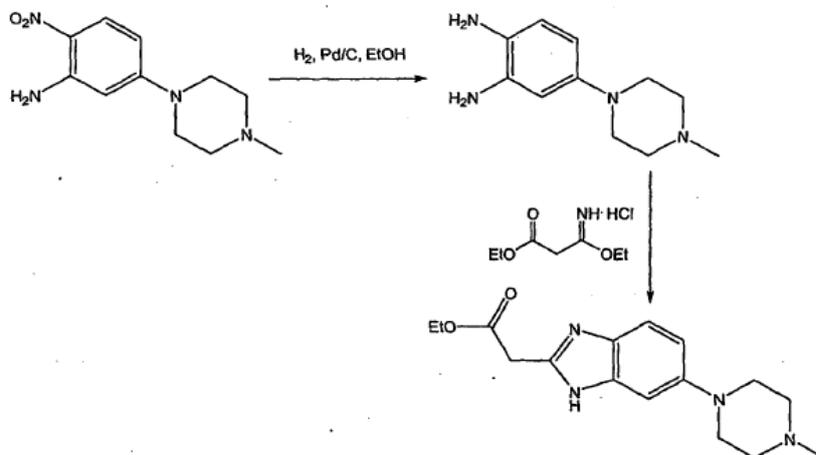
Se añadió 5-cloro-2-nitroanilina (308,2 g, 1,79 moles) a un matraz de fondo redondo de 5000 ml, de 4 bocas equipado con un agitador superior, condensador, entrada de gas, embudo de adición y sonda termométrica. Entonces se purgó el matraz con N₂. Se añadieron 1-metilpiperazina (758,1 g, 840 ml, 7,57 moles) y etanol 200 Proof (508 ml) al matraz de reacción con agitación. Se purgó de nuevo el matraz con N₂, y se mantuvo la reacción bajo N₂. Se calentó el matraz en una manta calefactora hasta una temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) y se mantuvo a esa temperatura hasta que se completó la reacción (normalmente de manera aproximada 40 horas) tal como se determinó mediante HPLC. Tras completarse la reacción, se interrumpió el calentamiento y se enfrió la reacción hasta una temperatura interna de aproximadamente 20°C a 25°C con agitación, y se agitó la reacción durante de 2 a 3 horas. Se añadieron cristales semente (0,20 g, 0,85 mmoles) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina a la mezcla de reacción a menos que ya se hubiese producido la precipitación. Se añadió agua (2.450 ml) a la mezcla de reacción con agitación a lo largo de un periodo de aproximadamente una hora mientras que se mantenía la temperatura interna en una temperatura que osciló entre aproximadamente 20°C y 30°C. Tras completarse la adición de agua, se agitó la mezcla resultante durante aproximadamente una hora a una temperatura de 20°C a 30°C. Entonces se filtró la mezcla resultante, y se lavaron el matraz y la torta de filtración con agua (3 x 2,56 l). Se secó el producto sólido de color amarillo dorado hasta un peso constante de 416 g (rendimiento del 98,6%) a vacío a aproximadamente 50°C en un horno de vacío.

Procedimiento C

Se añadió 5-cloro-2-nitroanilina (401 g, 2,32 moles) a un matraz de fondo redondo de 12 l, de 4 bocas equipado con un agitador superior, condensador, entrada de gas, embudo de adición y sonda termométrica. Entonces se purgó el matraz con N₂. Se añadieron 1-metilpiperazina (977 g, 1,08 l, 9,75 moles) y etanol al 100% (650 ml) al matraz de reacción con agitación. Se purgó de nuevo el matraz con N₂, y se mantuvo la reacción bajo N₂. Se calentó el matraz en una manta calefactora hasta una temperatura interna de 97°C (+/- 5°C) y se mantuvo a esa temperatura hasta que se completó la reacción (normalmente de manera aproximada 40 horas) tal como se determinó mediante HPLC. Tras completarse la reacción, se continuó el calentamiento y se enfrió la reacción hasta una temperatura interna de aproximadamente 80°C con agitación, y se añadió agua (3,15 l) a la mezcla por medio de un embudo de adición a lo largo de un periodo de 1 hora mientras que se mantenía la temperatura interna a 82°C (+/- 3°C). Después de completarse la adición de agua, se interrumpió el calentamiento y se dejó enfriar la mezcla de reacción a lo largo de un periodo no inferior a 4 horas hasta una temperatura interna de 20-25°C. Entonces se agitó la mezcla de reacción durante una hora adicional a una temperatura interna de 20-30°C. Entonces se filtró la mezcla resultante, y se lavaron el matraz y la torta de filtración con agua (1 x 1 l), etanol al 50% (1 x 1 l) y etanol al 95% (1 x 1 l). Se puso el producto sólido de color amarillo dorado en una bandeja de secado y se secó hasta un peso constante de 546 g (rendimiento del 99%) a vacío a aproximadamente 50°C en un horno de vacío.

B. Síntesis de éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético

Procedimiento A



Se equipó un matraz de 4 bocas, de 5000 ml con un agitador, termómetro, condensador y entrada/salida de gas. Se cargó el matraz equipado, con 265,7 g (1,12 moles. 1,0 eq.) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina y 2125 ml de EtOH 200 Proof. Se purgó la disolución resultante con N_2 durante 15 minutos. Luego, se añadieron 20,0 g de Pd al 5%/C (50% p/p de H_2O). Se agitó vigorosamente la reacción a 40-50°C (temperatura interna) mientras que se burbujeara H_2 a través de la mezcla. Se monitorizó la reacción cada hora para determinar la desaparición de la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina mediante HPLC. El tiempo de reacción típico fue de 6 horas.

Tras la desaparición de toda la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina de la reacción, se purgó la disolución con N_2 durante 15 minutos. Luego, se añadieron 440,0 g (2,25 moles) de clorhidrato de 3-etoxi-3-iminopropanoato de etilo como un sólido. Se agitó la reacción a 40-50°C (temperatura interna) hasta que se completó la reacción. Se monitorizó la reacción siguiendo la desaparición del compuesto de diamino mediante HPLC. El tiempo de reacción típico fue de 1-2 horas. Tras completarse la reacción, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de material filtrante Celite. Se lavó el material filtrante Celite con EtOH absoluto (2 x 250 ml), y se concentró el filtrado a presión reducida proporcionando un aceite espeso marrón/naranja. Se llevó el aceite resultante a 850 ml de una disolución de HCl al 0,37%. Entonces se añadió NaOH sólido (25 g) en una porción, y se formó un precipitado. Se agitó la mezcla resultante durante 1 hora y entonces se filtró. Se lavó el sólido con H_2O (2 x 400 ml) y se secó a 50°C en un horno de vacío proporcionando 251,7 g (74,1%) de éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético como un polvo de color amarillo pálido.

Procedimiento B

Se dotó un matraz de 4 bocas con camisa, de 5000 ml con un agitador mecánico, condensador, sonda de temperatura, entrada de gas y burbujeador de aceite. Se cargó el matraz equipado con 300 g (1,27 moles) de 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina y 2400 ml de EtOH 200 Proof (la reacción puede y se ha llevado a cabo con etanol al 95% y no es necesario usar etanol 200 Proof para esta reacción). Se agitó la disolución resultante y se purgaron con N_2 durante 15 minutos. Luego, se añadieron 22,7 g de Pd/C al 5% (50% p/p de H_2O) al matraz de reacción. Se purgó el recipiente de reacción con N_2 durante 15 minutos. Tras purgar con N_2 , se purgó el recipiente de reacción con H_2 manteniendo un flujo lento, pero constante de H_2 a través del matraz. Se agitó la reacción a 45-55°C (temperatura interna) mientras se burbujeara H_2 a través de la mezcla hasta que se consumió por completo el 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina tal como se determinó mediante HPLC. El tiempo de reacción típico era 6 horas.

Tras la desaparición de toda la 5-(4-metil-piperazin-1-il)-2-nitroanilina de la reacción, se purgó la disolución con N_2 durante 15 minutos. El producto intermedio de diamina es sensible al aire de modo que se tuvo cuidado en evitar la exposición al aire. Se añadieron 500 g (2,56 moles) de clorhidrato de 3-etoxi-3-iminopropanoato de etilo a la mezcla de reacción a lo largo de un periodo de aproximadamente 30 minutos. Se agitó la reacción a 45-55°C (temperatura interna) bajo N_2 hasta que se consumió por completo la diamina tal como se determinó mediante HPLC. El tiempo de reacción típico fue de aproximadamente 2 horas. Tras completarse la reacción, se filtró la reacción mientras estaba caliente a través de un lecho de Celite. Entonces se lavaron el matraz de reacción y Celite con EtOH 200 Proof (3 x 285 ml). Se combinaron los filtrados en un matraz de 5000 ml, y se eliminaron aproximadamente 3300 ml de etanol a vacío produciendo un aceite de color naranja. Se añadieron agua (530 ml) y luego HCl 1 M (350 ml) al aceite resultante, y se agitó la mezcla resultante. Se agitó vigorosamente la disolución resultante mientras que se añadía NaOH al 30% (200 ml) a lo largo de un periodo de aproximadamente 20 minutos manteniendo la temperatura interna en aproximadamente 25-30°C mientras se llevaba el pH hasta entre 9 y 10. Se agitó la suspensión resultante

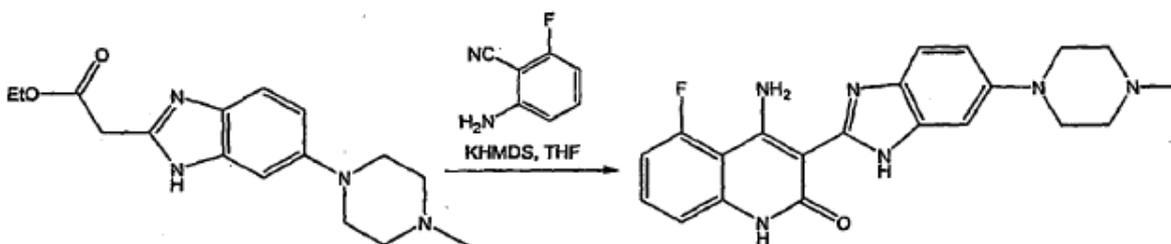
5 durante aproximadamente 4 horas mientras que se mantenía la temperatura interna en aproximadamente 20-25°C. Se filtró la mezcla resultante, y se lavó la torta de filtración con H₂O (3 x 300 ml). Se secó el sólido recogido hasta peso constante a 50°C a vacío en un horno de vacío proporcionando 345,9 g (90,1%) de éster etílico del ácido [6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético como un polvo de color amarillo pálido. En un procedimiento de tratamiento final alternativo, se combinaron los filtrados y se eliminó el etanol a vacío hasta que se había eliminado al menos aproximadamente el 90%. Entonces se añadió agua a un pH neutro al aceite resultante, y se enfrió la disolución hasta aproximadamente 0°C. Entonces se añadió lentamente una disolución acuosa de NaOH al 20% con agitación rápida para llevar el pH hasta 9,2 (leído con un pH-metro). Entonces se filtró la mezcla resultante y se secó tal como se describió anteriormente. El procedimiento de tratamiento final alternativo proporcionó el producto de color tostado claro a amarillo claro en rendimientos de hasta el 97%.

Método para reducir el contenido en agua del éster etílico del ácido [6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético

15 Se puso el éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (120,7 gramos) que se había sometido a tratamiento final previamente y se había secado hasta un contenido en agua de aproximadamente el 8-9% de H₂O en un matraz de fondo redondo de 2000 ml y se disolvió en etanol absoluto (500 ml). Se concentró la disolución de color ámbar para dar un aceite espeso usando un evaporador rotatorio con calentamiento hasta que se eliminó todo el disolvente. Se repitió el procedimiento dos veces más. Se dejó el aceite espeso así obtenido en el matraz y se puso en un horno de vacío calentado a 50°C durante la noche. Los resultados del análisis de Karl Fisher indicaron un contenido en agua del 5,25%. El contenido en agua reducido obtenido mediante este método proporcionó aumentos del rendimiento en el procedimiento del siguiente ejemplo. Pueden usarse otros disolventes tales como tolueno y THF en lugar del etanol para este proceso de secado.

C. Síntesis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Procedimiento A



25 Se disolvió el éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (250 g, 820 mmoles) (secado con etanol tal como se describió anteriormente) en THF (3800 ml) en un matraz de 5000 ml equipado con un condensador, agitador mecánico, sonda de temperatura, y se purgó con argón. Se añadió 2-amino-6-fluorobenzonitrilo (95,3 g, 700 mmoles) a la disolución, y se elevó la temperatura interna hasta 40°C. Cuando se hubieron disueltos todos los sólidos y la temperatura de disolución hubo alcanzado los 40°C, se añadió KHMDS sólido (376,2 g, 1890 mmoles) a lo largo de un periodo de 5 minutos. Cuando se completó la adición de la base de potasio, se obtuvo una disolución heterogénea de color amarillo, y la temperatura interna se había elevado hasta 62°C. Tras un periodo de 60 minutos, la temperatura interna disminuyó de nuevo hasta 40°C, y se determinó que se había completado la reacción mediante HPLC (no estaba presente ningún material de partida ni producto intermedio no ciclado). Entonces se extinguió la mezcla de reacción espesa vertiéndola en H₂O (6000 ml) y agitando la mezcla resultante hasta que hubo alcanzado la temperatura ambiente. Entonces se filtró la mezcla, y se lavó la almohadilla de filtración con agua (2X 1000 ml). Se puso el sólido de color amarillo brillante en una bandeja de secado y se secó en un horno de vacío a 50°C durante la noche proporcionando 155,3 g (47,9%) de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona deseada.

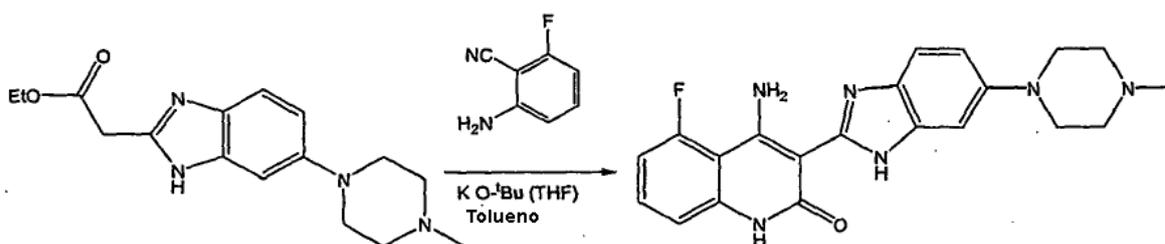
Procedimiento B

40 Se equipó un matraz de 4 bocas con camisa de 5000 ml con un aparato de destilación, una sonda de temperatura, una entrada de gas N₂, un embudo de adición y un agitador mecánico. Se cargó el éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-benzimidazol-2-il]-acético (173,0 g, 570 mmoles) en el reactor, y se purgó el reactor con N₂ durante 15 minutos. Entonces se cargó THF seco (2600 ml) en el matraz con agitación. Tras disolverse todo el sólido, se eliminó el disolvente mediante destilación (a vacío o atmosférica (la mayor temperatura ayuda a eliminar el agua) usando calor según fuese necesario. Después de haberse eliminado 1000 ml de disolvente, se detuvo la destilación y se purgó la reacción con N₂. entonces se añadieron 1000 ml de THF seco al recipiente de reacción, y

cuando se disolvió todo el sólido, se llevó a cabo de nuevo la destilación (a vacío o atmosférica) hasta que se hubieron eliminado otros 1000 ml de disolvente. Este proceso de adición de THF seco y eliminación de disolvente se repitió al menos 4 veces (en la 4ª destilación, se elimina el 60% del disolvente en lugar de sólo el 40% como en las 3 primeras destilaciones) tras lo cual se retiró una muestra de 1 ml para el análisis de Karl Fischer para determinar el contenido en agua. Si el análisis mostró que la muestra contenía menos del 0,20% de agua, entonces se continuó la reacción tal como se describe en el siguiente párrafo. Sin embargo, si el análisis mostró más del 0,20% de agua, entonces se continuó con el proceso de secado descrito anteriormente hasta que se logró un contenido en agua inferior al 0,20%.

Tras lograr un contenido en agua inferior a o de aproximadamente el 0,20% usando el procedimiento descrito en el párrafo anterior, se sustituyó el aparato de destilación por un condensador de reflujo, y se cargó la reacción con 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (66,2 g, 470 mmoles) (en algunos procedimientos se usan 0,95 equivalentes). Entonces se calentó la reacción hasta una temperatura interna de 38-42°C. Cuando la temperatura interna hubo alcanzado los 38-42°C, se añadió la disolución de KHMDS (1313 g, 1,32 moles, KHMDS al 20% en THF) a la reacción por medio del embudo de adición a lo largo de un periodo de 5 minutos manteniendo la temperatura interna en aproximadamente 38-50°C durante la adición. Cuando se completó la adición de la base de potasio, se agitó la reacción durante de 3,5 a 4,5 horas (en algunos ejemplos se agitó durante de 30 a 60 minutos y la reacción puede completarse en ese plazo de tiempo) mientras que se mantenía la temperatura interna en desde 38 hasta 42°C. Entonces se retiró una muestra de la reacción y se analizó mediante HPLC. Si no se completó la reacción, se añadió una disolución de KHMDS adicional al matraz a lo largo de un periodo de 5 minutos y se agitó la reacción a 38-42°C durante 45-60 minutos (la cantidad de disolución de KHMDS añadida se determinó mediante lo siguiente: si la razón de IPC es < 3,50, entonces se añadieron 125 ml; si 10,0 ≥ razón de IPC ≥ 3,50, entonces se añadieron 56 ml; si 20,0 ≥ razón de IPC ≥ 10, entonces se añadieron 30 ml. La razón de IPC es igual al área correspondiente a la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona) dividida entre el área correspondiente al producto intermedio no ciclado). Una vez que se completó la reacción (razón de IPC > 20), se enfrió el reactor hasta una temperatura interna de 25-30°C, y se cargó agua (350 ml) en el reactor a lo largo de un periodo de 15 minutos mientras que se mantenía la temperatura interna en 25-35°C (en una alternativa, se lleva a cabo la reacción a 40°C y se añade agua en un plazo de 5 minutos. La extinción más rápida reduce la cantidad de impurezas que se forman con el tiempo). Entonces se sustituyó el condensador de reflujo por un aparato de destilación y se eliminó el disolvente mediante destilación (a vacío o atmosférica) usando calor según se requiera. Después de haberse eliminado 1500 ml de disolvente, se interrumpió la destilación y se purgó la reacción con N₂. Entonces se añadió agua (1660 ml) al matraz de reacción mientras que se mantenía la temperatura interna en 20-30°C. Entonces se agitó la mezcla de reacción a 20-30°C durante 30 minutos antes de enfriarla hasta una temperatura interna de 5-10°C y luego se agitó durante 1 hora. Se filtró la suspensión resultante, y se lavaron el matraz y la torta de filtración con agua (3 x 650 ml). Se secó el sólido así obtenido hasta peso constante a vacío a 50°C en un horno de vacío proporcionando 103,9 g (rendimiento del 42,6%) de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona como un polvo de color amarillo.

Procedimiento C



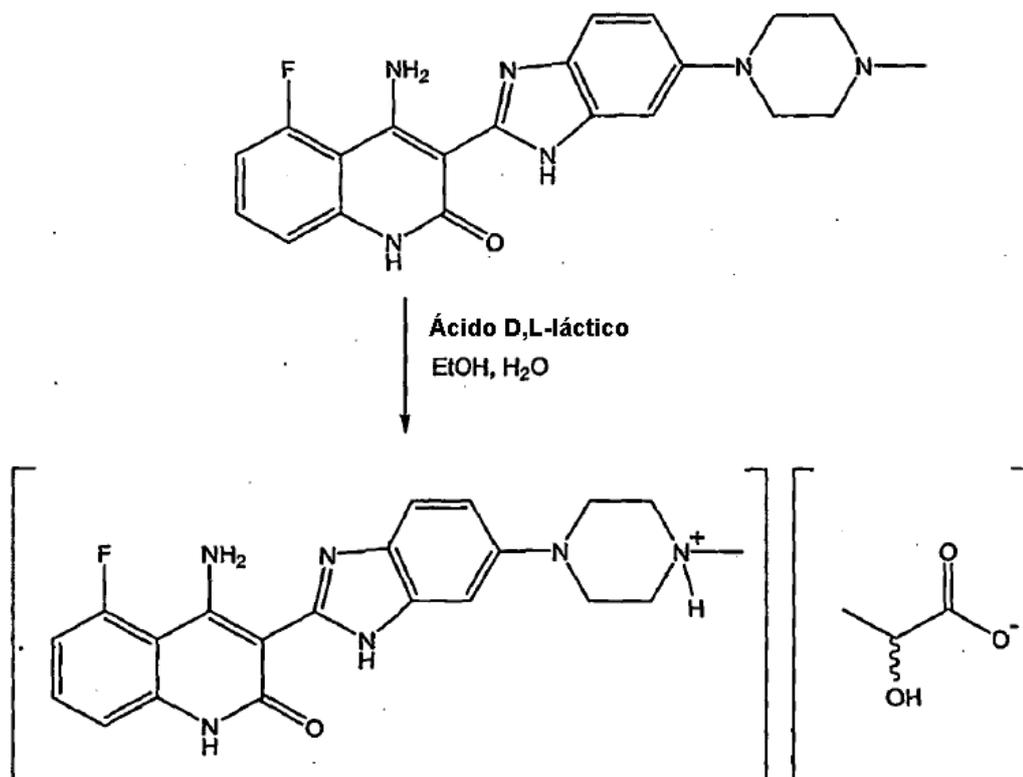
Se cargaron éster etílico del ácido [6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-acético (608 g, 2,01 moles) (secado) y 2-amino-6-fluoro-benzonitrilo (274 g, 2,01 moles) en un matraz de 12 l de 4 bocas apoyado sobre una manta calefactora y equipado con un condensador, agitador mecánico, entrada de gas y sonda de temperatura. Se purgó el recipiente de reacción con N₂, y se cargó tolueno (7,7 l) en la mezcla de reacción mientras que se agitaba. Se purgó de nuevo el recipiente de reacción con N₂ y se mantuvo bajo N₂. Se elevó la temperatura interna de la mezcla hasta que se logró una temperatura de 63°C (+/- 3°C). Se mantuvo la temperatura interna de la mezcla en 63°C (+/- 3°C) mientras que se destilaban aproximadamente 2,6 l de tolueno del matraz a presión reducida (380 +/- 10 torr, cabeza de destilación t = 40°C (+/- 10°C) (se usó el análisis de Karl Fischer para comprobar el contenido en agua en la mezcla. Si el contenido en agua era superior al 0,03%, entonces se añadieron otros 2,6 l de tolueno y se repitió la destilación. Se repitió este proceso hasta que se logró un contenido en agua inferior al 0,03%). Tras lograrse un contenido en agua inferior al 0,03%, se interrumpió el calentamiento, y se enfrió la reacción bajo N₂ hasta una temperatura interna de 17-19°C. Entonces se añadió t-butóxido de potasio en THF (al 20% en THF; 3,39 kg, 6,04 moles de t-butóxido de potasio) a la reacción bajo N₂ a una velocidad tal que la temperatura interna de la

reacción se mantuvo por debajo de los 20°C. Tras completarse la adición del t-butoxido de potasio, se agitó la reacción a una temperatura interna inferior a 20°C durante 30 minutos. Entonces se elevó la temperatura hasta 25°C, y se agitó la reacción durante al menos 1 hora. Entonces se elevó la temperatura hasta 30°C, y se agitó la reacción durante al menos 30 minutos. Entonces se monitorizó la reacción para determinar si era completa usando HPLC para comprobar el consumo de los materiales de partida (normalmente en 2-3 horas, se consumieron ambos materiales de partida (menos del 0,5% mediante % de área de HPLC)). Si no se completó la reacción tras 2 horas, se añadieron de una vez otros 0,05 equivalentes de t-butoxido de potasio, y se completó el proceso hasta que la HPLC mostró que la reacción era completa. Tras completarse la reacción, se añadieron 650 ml de agua a la mezcla de reacción con agitación. Entonces se calentó la reacción hasta una temperatura interna de 50°C y se eliminó por destilación el THF (aproximadamente 3 l en volumen) a presión reducida de la mezcla de reacción. Entonces se añadió gota a gota agua (2,6 l) a la mezcla de reacción usando un embudo de adición. Entonces se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó durante al menos 1 hora. Entonces se filtró la mezcla, y se lavó la torta de filtración con agua (1,2 l), con etanol al 70% (1,2 l), y con etanol al 95%(1,2 l). Se puso el sólido de color amarillo brillante en una bandeja de secado y se secó en un horno de vacío a 50°C hasta que se obtuvo un peso constante proporcionando 674 g (85,4%) de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona deseada.

Purificación de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

Se puso un matraz de 4 bocas de 3000 ml equipado con un condensador, sonda de temperatura, entrada de gas N₂ y agitador mecánico en una manta calefactora. Entonces se cargó el matraz con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (101,0 g, 0,26 moles), y se suspendió el sólido de color amarillo en etanol al 95% (1000 ml) y se agitó. En algunos casos se usó una razón de disolventes 8:1. Entonces se calentó la suspensión hasta un reflujo suave (temperatura de aproximadamente 76°C) con agitación a lo largo de un periodo de aproximadamente 1 hora. Entonces se agitó la reacción durante 45-75 minutos mientras se sometía a reflujo. En este punto, se retiró el calor del matraz y se dejó enfriar la suspensión hasta una temperatura de 25-30°C. Entonces se filtró la suspensión, y se lavó la almohadilla de filtración con agua (2 x 500 ml). Entonces se puso el sólido de color amarillo en una bandeja de secado y se secó en un horno de vacío a 50°C hasta que se obtuvo un peso constante (normalmente 16 horas) obteniéndose 97,2 g (96,2%) del producto purificado como un polvo de color amarillo.

D. Preparación de sal de ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona

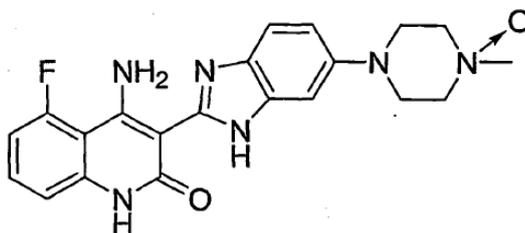


Se equipó un matraz de 4 bocas con camisa de 3000 ml con un condensador, una sonda de temperatura, una entrada de gas N₂ y un agitador mecánico. Se purgó el recipiente de reacción con N₂ durante al menos 15 minutos y entonces se cargó con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 g, 1,23 moles). Se preparó una disolución de ácido D,L-láctico (243,3 g, 1,72 moles de monómero, véase el siguiente párrafo), agua (339 ml) y etanol (1211 ml) y entonces se cargaron en el matraz de reacción. Se comenzó la agitación a una velocidad media, y se calentó la reacción hasta una temperatura interna de 68-72°C. Se mantuvo la temperatura interna de la reacción en 68-72°C durante 15-45 minutos y entonces se interrumpió el calentamiento. Se filtró la mezcla resultante a través de una frita de 10-20 micras que recogió el filtrado en un matraz de 12 l. Se equipó el matraz de 12 l con una sonda de temperatura interna, un condensador de reflujo, un embudo de adición, una entrada y salida de gas y un agitador superior. Entonces se agitó el filtrado a una velocidad media y se calentó a reflujo (temperatura interna de aproximadamente 78°C). Mientras que se mantenía un reflujo suave, se cargó etanol (3,596 ml) en el matraz a lo largo de un periodo de aproximadamente 20 minutos. Entonces se enfrió el matraz de reacción hasta una temperatura interna que osciló entre aproximadamente 64-70°C en un plazo de 15-25 minutos y se mantuvo esta temperatura durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. Se inspeccionó el reactor para determinar la presencia de cristales. Si no había cristales presentes, entonces se añadieron cristales de la sal de ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (484 mg, 0,1% molar) al matraz, y se agitó la reacción a 64-70°C durante 30 minutos antes de inspeccionar de nuevo el matraz para determinar la presencia de cristales. Una vez que estaban presentes cristales, se redujo la agitación a una velocidad baja y se agitó la reacción a 64-70°C durante 90 minutos adicionales. Entonces se enfrió la reacción hasta aproximadamente 0°C a lo largo de un periodo de aproximadamente 2 horas, y se filtró la mezcla resultante a través de un filtro con frita de 25-50 micras. Se lavó el reactor con etanol (484 ml) y se agitó hasta que la temperatura interna era de aproximadamente 0°C. Se usó el etanol frío para lavar la torta de filtración, y se repitió este procedimiento 2 veces más. Se secó el sólido recogido hasta un peso constante a 50°C a vacío en un horno de vacío proporcionando 510,7 g (85,7%) de la sal del ácido láctico de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona cristalina de color amarillo. Se usaron normalmente un dique de caucho o condiciones inertes durante el proceso de filtración. Aunque el sólido seco no parece ser muy higroscópico, la torta de filtración húmeda tiende a captar agua y se vuelve pegajosa. Se tomaron precauciones para evitar la exposición prolongada de la torta de filtración húmeda a la atmósfera.

El ácido láctico comercial generalmente contiene aproximadamente el 8-12% p/p de agua, y contiene dímeros y trímeros además del ácido láctico monomérico. La razón molar del dímero del ácido láctico con respecto al monómero es generalmente de manera aproximada 1,0:4,7. El ácido láctico de calidad comercial puede usarse en el proceso descrito en el párrafo anterior ya que la sal de monolactato precipita preferentemente a partir de la mezcla de reacción.

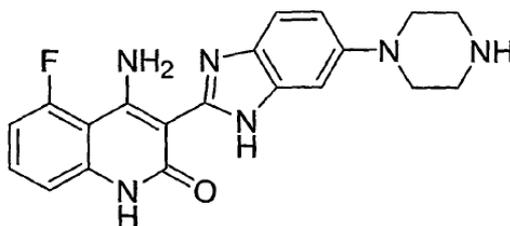
Identificación de metabolitos

Se han identificado dos metabolitos de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-piperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]-1H-quinolin-2-ona (compuesto 1) y se caracterizaron en plasma de rata combinado de un estudio toxicológico de 2 semanas tal como se describe en las referencias incorporadas al presente documento. Los dos metabolitos identificados eran el compuesto de N-óxido de piperazina (compuesto 2) y el compuesto N-desmetilado (compuesto 3) mostrados a continuación.



Compuesto 2

40



Compuesto 3

Las Cl_{50} de los compuestos 1-3

Se midió la actividad cinasa de varias proteínas tirosina cinasas usando los procedimientos expuestos a continuación para los compuestos 1-3 para proporcionar los valores de Cl_{50} mostrados en la siguiente tabla.

5

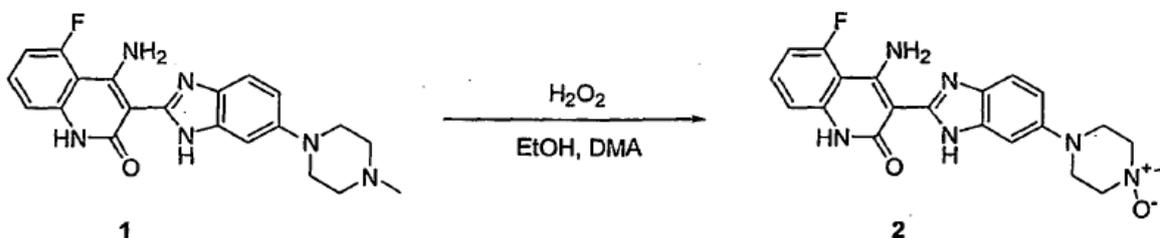
Tabla. Las Cl_{50} de los compuestos 1-3

Compuesto	Cl_{50} (μM)					
	VEGFR fit	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Fit3	c-kit
Compuesto 1	0,010	0,013	0,008	0,027	0,0001	0,0015
Compuesto 2	0,004	0,009	0,005	0,010	0,0004	0,0002
Compuesto 3	0,019	0,012	0,019	0,037	0,0001	0,0002

Síntesis de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metil-4-oxidopiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 2) y 4-amino-5-fluoro-3-(6-piperazin-1-il-1H-bencimidazol-2-il)quinolin-2(1H)-ona (compuesto 3)

10 Para confirmar las estructuras de los metabolitos identificados del compuesto 1, se sintetizaron independientemente los metabolitos.

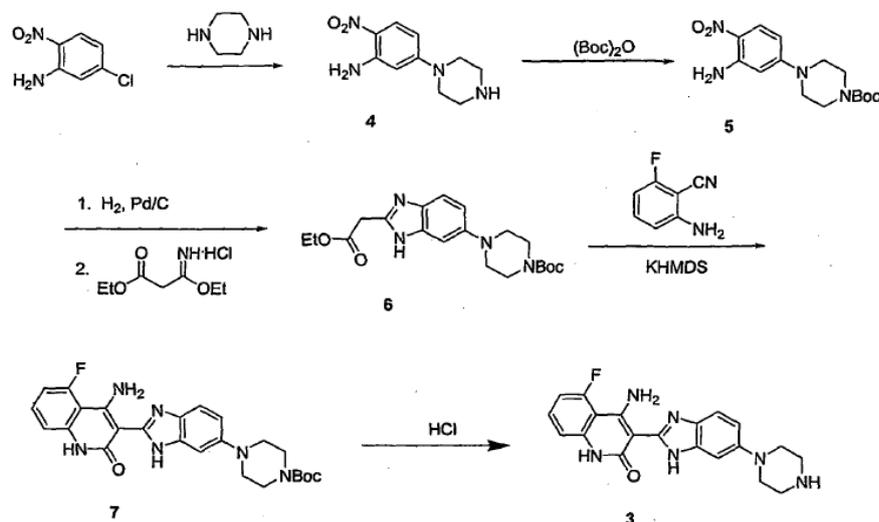
El compuesto 2, el metabolito de N-óxido del compuesto 1, se sintetizó tal como se muestra en el esquema a continuación. Se calentó el compuesto 1 en una mezcla de etanol, dimetilacetamida y peróxido de hidrógeno. Tras completarse la reacción, se aisló el compuesto 2 mediante filtración y se lavó con etanol. Si era necesario, el producto podía purificarse adicionalmente mediante cromatografía en columna.



15

20

El compuesto 3, el metabolito de N-desmetilo del compuesto 1, se sintetizó tal como se muestra en el esquema a continuación. Se trató 5-cloro-2-nitroanilina con piperazina para proporcionar el compuesto 4 que se protegió posteriormente con un grupo butiloxicarbonilo (Boc) para proporcionar el compuesto 5. La reducción del grupo nitro seguida por la condensación con el éster etílico del ácido 3-etoxi-3-iminopropiónico dio el compuesto 6. La condensación del compuesto 6 con 6-fluoroantranilnitrilo usando hexametildisilazida de potasio como la base proporcionó el compuesto 7. Se trató el compuesto 7 en bruto con HCl acuoso para proporcionar el metabolito deseado como un sólido de color amarillo/marrón tras la purificación.



Procedimientos de ensayo

Serina/treonina cinasas

Se midió la actividad cinasa de diversas proteínas serina/treonina cinasas proporcionando ATP y una proteína o péptido adecuado que contienen un residuo de aminoácido de serina o treonina para la fosforilación y se sometió a ensayo para determinar la transferencia del resto de fosfato al residuo de serina o treonina. Se expresaron las proteínas recombinantes que contenían los dominios cinasa de las enzimas GSK-3, RSK-2, PAR-1, NEK-2, y CHK1 en células de insectos Sf9 usando un sistema de expresión de baculovirus (InVitrogen) y se purificaron por medio de la interacción anticuerpo - Glu (para los constructos marcados con epítipo de Glu) o mediante cromatografía de iones metálicos (para los constructos marcados con His₆ (SEQ ID NO: 1)). Se coexpresaron la ciclina B y Cdc2 (constructo de fusión de GTS) en células de insectos Sf9 usando un sistema de expresión de baculovirus. Cdk2/ciclina A activo, recombinante está disponible comercialmente y se adquirió de Upstate Biotechnology. La enzima Cdc2 purificada usada en el ensayo estaba disponible comercialmente, y puede adquirirse de New England Bio Labs. Para cada ensayo, se diluyeron en serie los compuestos de prueba en DMSO y luego se mezclaron con el tampón de reacción de cinasa apropiado más 5-10 nM de ATP marcado con gamma ³³P. Se añadieron la proteína cinasa y el sustrato peptídico biotinilado apropiado para dar un volumen final de 150 μl . Se incubaron las reacciones durante 3-4 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron transfiriendo a una placa de microtitulación blanca recubierta con estreptavidina (Thermo LabSystems) que contenía 100 μl de tampón de reacción de parada. El tampón de reacción de parada consiste de ATP no marcado 50 mM y EDTA 30 mM. Tras 1 hora de incubación, se lavaron las placas de estreptavidina con PBS, y se añadieron 200 μl de líquido de centelleo Microscint 20 por pocillo. Se sellaron las placas y se contaron usando un contador TopCount. Se calculó la concentración de cada compuesto para el 50% de inhibición (CI_{50}) empleando regresión no lineal usando el software de análisis de datos XL Fit.

El tampón de reacción contenía Tris-HCl 30 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 2 mM, EDTA 4 mM, beta-glicerofosfato 25 mM, MnCl₂ 5 mM, BSA/PBS al 0,01%, sustrato peptídico 0,5 μM , y ATP no marcado 1 μM . Se usó la enzima GSK-3 a 27 nM, CHK1 a 5 nM, Cdc2 a 1 nM, Cdk2 a 5 nM, y Rsk2 a 0,044 unidades/ml. Para el ensayo de GSK-3, se usó el péptido biotina-CREB (biotina-SGSGKRREILSRP(pS)YR-NH₂ (SEQ ID NO: 4)). Para el ensayo de CHK1, se usó un péptido biotina-Cdc25c (Biotina-[AHX]SGSGSGLYRSPSPENLNRPR[CONH₂] (SEQ ID NO: 5)). Para los ensayos de Cdc2 y Cdk2, se usó un péptido biotina-Histona H1 ([IcBiotina]GGGGPKTPKKAKKL[CONH₂] (SEQ ID NO: 6)). En el ensayo de Rsk2, se usaron un péptido biotina-p70, MgCl₂ 15 mM, DTT 1mM, EDTA 5 mM, péptido inhibidor de PKC 2,7 μM , y péptido inhibidor de PKA 2,7 μM .

Tirosina cinasas

Se midió la actividad cinasa de varias proteínas tirosina cinasas proporcionando ATP y un péptido o proteína apropiado que contiene un residuo de aminoácido de tirosina para la fosforilación y se sometió a ensayo para determinar la transferencia del resto de fosfato al residuo de tirosina. Se expresaron las proteínas recombinantes que correspondían a los dominios citoplásmicos de los receptores FLT-1 (VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR α , PDGFR β , y FGFR1 en células de insectos Sf9 usando un sistema de expresión de baculovirus (InVitrogen) y pudieron purificarse por medio de la interacción anticuerpo - Glu (para los constructos marcados con epítipo de Glu) o mediante cromatografía de iones metálicos (para los constructos marcados con His₆ (SEQ ID NO:

1)) Para cada ensayo, se diluyeron en serie los compuestos de prueba en DMSO y luego se mezclaron con un tampón de reacción de cinasa apropiado más ATP. Se añadieron la proteína cinasa y un sustrato peptídico biotinilado apropiado para dar un volumen final de 50-100 μl , se incubaron las reacciones durante 1-3 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron mediante la adición de 25-50 μl de EDTA 45 mM, Hepes 50 mM pH 7,5.

5 Se transfirió la mezcla de reacción de parada (75 μl) a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) y se incubó durante 1 hora. Se midió el producto del péptido fosforilado con el sistema de fluorescencia de resolución temporal DELFIA (Wallac o PE Biosciences), usando un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con europio PT66 con la modificación de que el tampón de ensayo DELFIA se complementó con MgCl_2 1 mM para la dilución del anticuerpo. Se leyó la fluorescencia de resolución temporal en un fluorómetro 1232 DELFIA de Wallac o un lector de señales múltiples PE Victor II. Se calculó la concentración de cada compuesto para el 50% de inhibición (CI_{50}) empleando la regresión no lineal usando el software de análisis de datos XL Fit.

10 Se sometieron a ensayo las cinasas FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tie-2, y FGFR1 en Hepes 50 mM pH 7,0, MgCl_2 2 mM, MnCl_2 10 mM, NaF 1 mM, DTT 1 mM, BSA 1 mg/ml, ATP 2 μM , y sustrato peptídico biotinilado correspondiente 0,20-0,50 μM . Se añadieron las cinasas FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, y FGFR1 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$, o 0,1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Para el ensayo de cinasa de PDGFR, se usaron 120 $\mu\text{g/ml}$ de enzima con las mismas condiciones de tampón que anteriormente, excepto en que se cambiaron las concentraciones de ATP y de sustrato peptídico a ATP 1,4 μM , y sustrato peptídico biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO: 2) 0,25 μM .

15 Las tirosina cinasas activas y recombinantes Fyn, y Lck están disponibles comercialmente y se adquirieron de Upstate Biotechnology. Para cada ensayo, se diluyeron en serie los compuestos de prueba en DMSO y luego se mezclaron con un tampón de reacción de cinasa apropiado más ATP marcado con gamma ³³P 10 nM. Se añadieron la proteína cinasa y el sustrato peptídico biotinilado apropiado para dar un volumen final de 150 μl . Se incubaron las reacciones durante 3-4 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron transfiriendo a una placa de microtitulación blanca recubierta con estreptavidina (Thermo LabSystems) que contenía 100 μl de tampón de reacción de parada de EDTA 100 mM y ATP no marcado 50 μM . Tras 1 hora de incubación, se lavaron las placas de estreptavidina con PBS y se añadieron 200 μl de líquido de centelleo Microscint 20 por pocillo. Se sellaron las placas y se contaron usando un contador TopCount. Se calculó la concentración de cada compuesto para el 50% de inhibición (CI_{50}) empleando regresión no lineal usando el software de análisis de datos XL Fit.

20 El tampón de reacción de cinasa para Fyn, Lck, y c-ABL contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl_2 15 mM, MnCl_2 30 mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, fosfato de beta-glicerol 25 mM, BSA/PBS al 0,01%, 0,5 μM del sustrato peptídico apropiado (sustrato peptídico Src biotinilado: biotina-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH₂ (SEQ ID NO: 3) para Fyn y Lck), ATP no marcado 1 μM , y cinasa 1 nM.

25 Se midió la actividad cinasa de c-Kit y FLT-3 proporcionando ATP y un péptido o proteína que contenía un residuo de aminoácido de tirosina para la fosforilación y se sometió a ensayo para determinar la transferencia del resto de fosfato al residuo de tirosina. Se adquirieron proteínas recombinantes que correspondían a los dominios citoplásmicos de los receptores de c-Kit y FLT-3 (Prokinase). Para las pruebas, un compuesto a modo de ejemplo, por ejemplo la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se diluyó en DMSO y luego se mezcló con el tampón de reacción de cinasa descrito a continuación más ATP. Se añadieron la proteína cinasa (c-Kit o FLT-3) y el sustrato peptídico biotinilado (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO: 2)) para dar un volumen final de 100 μl . Se incubaron estas reacciones durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se detuvieron mediante la adición de 50 μl de EDTA 45 mM, HEPES 50 mM, pH 7,5. Se transfirió la mezcla de reacción de parada (75 μl) a una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Boehringer Mannheim) y se incubó durante 1 hora. Se midió el producto del péptido fosforilado con el sistema de fluorescencia de resolución temporal DELPHIA (Wallac o PE Biosciences), usando un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con europio, PT66, con la modificación de que el tampón de ensayo DELFIA se complementó con MgCl_2 1 mM para la dilución del anticuerpo. Se determinaron los valores de fluorescencia de resolución temporal en un fluorómetro 1232 DELFIA de Wallac o un lector de señales múltiples PE Victor II. Se calculó la concentración de cada compuesto para el 50% de inhibición (CI_{50}) empleando la regresión no lineal usando el software de análisis de datos XL Fit.

30 Se sometieron a ensayo las cinasas FLT-3 y c-Kit en Hepes 50 mM pH 7,5, NaF 1 mM, MgCl_2 2 mM, MnCl_2 10 mM y BSA 1 mg/ml, ATP 8 μM y 1 μM del sustrato peptídico biotinilado correspondiente (biotina-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO: 2)). Se sometió a ensayo la concentración de las cinasas FLT-3 y c-Kit a 2 nM.

Evaluación de imágenes amplia y en tiempo real de la eficacia de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-]quinolin-2(1H)-ona en un modelo preclínico de mieloma múltiple

35 El mieloma múltiple (MM), un neoplasma de células B caracterizado por la expansión clonal de células plasmáticas en la médula ósea hematopoyética, sigue siendo un tumor maligno hematológico letal debido al desarrollo de resistencia al fármaco intrínseca y adquirida a pesar de la introducción de quimioterapia con dosificaciones altas

convencional. Se ha demostrado que el microentorno de la médula ósea, donde las células de MM crecen y se alojan preferentemente, desempeña un papel crucial en el desarrollo de la resistencia a terapias novedosas y convencionales para el MM. Por tanto, los agentes molecularmente dirigidos, que se dirigen no sólo a las células de MM sino también a la interacción del microentorno de la médula ósea con las células de MM, ofrecen una posible oportunidad para tratar el MM. Los avances recientes en la comprensión de la patología molecular del MM han proporcionado dianas terapéuticas novedosas para el tratamiento de esta enfermedad. FGFR-3 que se expresa de manera ectópica y desregulada, lo que se produce en aproximadamente el 15% de los pacientes con MM que resultan de la translocación cromosómica t(4;14) y confiere un pronóstico particularmente malo en la práctica clínica, se ha convertido en una diana terapéutica atractiva para el MM.

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) es un inhibidor de molécula pequeña que se dirige a múltiples tirosina cinasas receptoras incluyendo VEGFR-2 y PDGFR (CI₅₀ ~20 nM en ensayos de cinasa) y FGFR-3 (CI₅₀ ~5 nM en ensayos de cinasa). Se ha demostrado que la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona inhibe la autofosforilación de FGFR-3 y la proliferación celular en las células de MM mutantes de FGFR-3 *in vitro* (S. Trudel *et al.*; Blood; en prensa). Para evaluar la eficacia antimieloma de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se desarrolló un modelo preclínico de MM *in vivo* en el que se desarrollaron lesiones multiorgánicas del MM tras la inyección i.v. en la vena de la cola de células humanas KMS-11-luc que expresan FGFR-3 mutante (Y373C) transfectadas de manera estable con un constructo de luciferasa. Se empleó obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI) para monitorizar de manera no invasiva la metástasis y el crecimiento *in vivo* de tumores de MM KMS-11-luc. Se capturó satisfactoriamente la detección temprana y el crecimiento ampliamente monitorizado en serie de lesiones metastásicas mediante BLI con este modelo. Se encontró que casi todos los animales a los que se inyectaron las células tumorales KMS-11-luc desarrollaron lesiones de MM ya en el día 26, que se ubicaron principalmente en la columna vertebral, el cráneo y la pelvis dando como resultado el frecuente desarrollo de parálisis en este modelo. Se investigó la eficacia antimieloma de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en este modelo de MM del KMS-11-luc *in vivo* inyectado i.v. y se encontró que la administración oral diaria de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona a 20 mg/kg, una dosis que se demostró que inhibe la fosforilación de ERK en tumores KMS-11-luc *in vivo*, dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral de KMS-11, tal como se detectó mediante la obtención de imágenes por BLI en serie. Además, la actividad del crecimiento antitumoral de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona se traduce en una mejora significativa en la tasa de supervivencia animal en comparación con el tratamiento con vehículo. Estos estudios proporcionan una base preclínica adicional para ensayos clínicos de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en pacientes con MM y justifican una evaluación adicional de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en la terapia de combinación con agentes convencionales u otros dirigidos molecularmente en este modelo *in vivo* de KMS-11-luc.

Método

Se obtuvo un cohorte de 18 ratones SCID-beige inmunodeficientes hembras (aproximadamente de 8 semanas de edad) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se alojaron en una instalación de barrera en jaulas estériles con filtro superior con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se llevaron a cabo todos los experimentos en una instalación acreditada por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Internacional y según todas las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee and the Guide for The Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council). Se cultivaron células de MM KMS-11-luc que albergan mutantes de FGFR-3 (Y373C) en medio de Iscove + FBS al 10% + L-glutamina y se pasaron dos veces/semana en un intervalo de 1:2 a 1:4. Se implantaron las células mediante inyección intravenosa en la vena de la cola a 10 x10⁶ células por 100 µl de HBSS por ratón. Se irradiaron los ratones a 3 GY (3,2 minutos) en el día de la implantación celular. Los animales recibieron tratamiento oral diario de 20 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona o vehículo (n = 9 cada grupo) comenzando a las 48 horas tras la inyección de las células KMS-11-luc. Se obtuvieron imágenes de bioluminiscencia (BLI) usando un sistema de obtención de imágenes IVIS® (Xenogen) que incluye una cámara CCD enfriada, de alta sensibilidad montada en una caja para cámara oscura. Las imágenes y mediciones de señales bioluminiscentes, tal como se cuantificaron mediante fotones/segundo, se adquirieron en el día 8 y una vez a la semana a partir de entonces, tras la inyección del sustrato de luciferasa. Se monitorizaron los pesos corporales de los animales dos veces por semana y se registraron observaciones clínicas diariamente. Según las directrices y la normativa para el cuidado de animales, se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂ en el caso de parálisis o de que su calidad de vida se viera comprometida de manera importante.

Resultados

En el día 8 tras inyectarse por vía intravenosa las células KMS-11-luc en ratones SCID-beige, la obtención de imágenes de cuerpo completo demostró el desarrollo de crecimiento celular y posibles lesiones de MM ubicadas principalmente en regiones extraesqueléticas incluyendo pulmones, hígado y bazo. Se observaron claramente

lesiones esqueléticas múltiples difusas típicas incluyendo de cráneo, pelvis y columna vertebral en la mayoría de los ratones entre el día 41 y el día 48 (tal como se observan en las imágenes BLI) lo que se asoció con parálisis en las extremidades posteriores, dando como resultado el sacrificio de los ratones según el protocolo.

5 Se sometió a prueba la eficacia antimieloma de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en KMS-11-luc en este modelo *in vivo*. Los ratones empezaron a recibir diariamente el tratamiento oral del compuesto 1 a 20 mg/kg a las 48 horas tras la inyección de las células KMS-11-luc (n= 9 ratones/grupo). Se realizó la monitorización en serie y amplia de los recuentos de fotones en cada animal en un programa semanal. Se demostró un recuento de fotones medio significativamente inferior en el grupo tratado con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona en comparación con el tratamiento con vehículo tal como se muestra en la figura 1. Esto se observó fácilmente en comparación con las imágenes mediante BLI de cuerpo completo tomadas de ratones inyectados con KMS-11-luc tratados con vehículo y de los tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. De manera interesante, la diseminación del patrón de las células de mieloma múltiple KMS-11 en los ratones tratados con el compuesto 1 también fue significativamente menos dispersa. La metástasis se limitó a áreas del abdomen y la espalda y no se encontró en mucha cantidad en regiones craneales, de las vértebras o de las extremidades posteriores.

La reducción del recuento de fotones en ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona quedó bien reflejada mediante un aumento significativo en el tiempo de supervivencia en comparación con los ratones tratados con vehículo. En el día 91, 5 de los 9 animales de aquellos ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona seguían vivos con estados saludables globales. En contraposición, se sacrificó a la mayoría de los animales en el grupo tratado con vehículo aproximadamente en el día 50. Además, los ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, toleraron bien este tratamiento durante el largo periodo de este estudio. Debido a la mejora obvia en el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona, se terminó el estudio en el día 91 por consideraciones prácticas.

Estudios adicionales con respecto a la inhibición de cinasa en general, a la inhibición de FGFR3, y al tratamiento de cánceres incluyendo mieloma múltiple con 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona se exponen en la solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2004/0092535, y en la solicitud de patente estadounidense n.º 10/983.174, la solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0220196, y la patente estadounidense n.º 6.605.617.

Actividad de la 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) en modelos experimentales de xenoinjerto de tumor de LMA humana

La 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) es una molécula pequeña multidirigida, oralmente activa, novedosa, que muestra una potente actividad frente a la cinasa FLT3 y V RTK de clase III, IV, y V implicadas en la proliferación celular tumoral y endotelial. Dada la relevancia de las mutaciones de FLT3 en la leucemia mielógena aguda (LMA), se sometió a prueba el compuesto 1 en dos líneas celulares de leucemia humanas con estados mutacionales de FLT3 diferentes (MV4;11 con ITD de FLT3 frente a RS4;11 con WT de FLT3). La actividad antiproliferativa del compuesto 1 frente a MV4;11 era ~24 veces superior en comparación con RS4;11, lo que indica una inhibición más potente de FLT3 activada de manera constitutiva. La modulación dependiente de la dosis de la señalización posterior y la fosforilación del receptor (STAT5 y ERK/MAPK) en células MV4;11 con el compuesto 1 confirmó el mecanismo molecular de acción. Se consiguió la modulación diana de pFLT3, pERK en tumores MV4;11 a dosis biológicamente activas del compuesto 1. Se demostraron regresiones tumorales y la erradicación de células de LMA de la médula ósea (MO) en modelos de xenoinjerto leucémico injertado en la MO y subcutáneos. Las respuestas tumorales se caracterizaron mediante una proliferación celular disminuida y tinción inmunohistoquímica positiva para determinar caspasa-3 activa y PARP escindida, lo que sugiere que la muerte celular estaba mediada por la apoptosis. Estos datos apoyan la evaluación clínica del compuesto 1 en LMA.

Líneas celulares

50 Se obtuvieron las células leucémicas humanas MV4;11 (ITD de FLT3) y RS4;11 (WT de FLT3) de la Colección Americana de Cultivos Tisulares (Rockville, MD) 24-26. Se cultivaron las células MV4;11 en medio Dulbecco modificado por Iscoves (IMBM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) que contenía L-glutamina 4 mM, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos 5 ng/ml (GM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN) y estreptomycin y penicilina al 1%. Se cultivaron RS4;11 en medios RPMI-1640 que contenían FBS al 10%, piruvato de sodio 1 mM y HEPES 10 mM (pH 7.4). Las células se hicieron crecer como cultivos en suspensión y se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C y CO₂ al 5%.

Ensayos de cinasa

Se realizaron ensayos de cinasa de FLT3 *in vitro* con enzima FLT3 2 nM (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA) en presencia de ATP 8 μ M y diluciones en serie del compuesto 1. Se incubó el sustrato peptídico fosforilado a una concentración final de 1 μ M con un anticuerpo anti-fosfotirosina marcado con europio (PT66) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). Se detectó el europio usando fluorescencia de resolución temporal. Se calculó la CI_{50} usando regresión no lineal.

Ensayos de proliferación

Se sembraron las células en placas de microtitulación de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se añadieron diluciones en serie del compuesto 1. Se estimularon las células RS4;11 con ligando de FLT3 (100 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN). Al final del periodo de incubación (72 h a 37°C), se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS (Promega, Madison, WI). Se calcularon los valores de CE_{50} usando regresión no lineal, y se definieron como la concentración necesaria para el 50% de reducción en la absorbancia de células tratadas frente a control no tratadas.

Análisis de inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western

Para los experimentos *in vitro*, se trataron células MV4;11 y RS4;11 con el compuesto 1 durante 3 horas. Se estimularon las células RS4;11 con ligando de FLT3 (100 ng/ml) durante 15 minutos tras la incubación con el compuesto 1. Tras la incubación con el fármaco, las células se recogieron, se lavaron con PBS enfriado con hielo y se lisaron con tampón RIPA (Nonidet P-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, dodecilsulfato de sodio al 0,1% en 1X solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2) que contenía inhibidores de proteasa (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) e inhibidores de fosfatasa (Sigma, St. Louis, MO). Para los análisis de la modulación diana *in vivo*, se congelaron de manera instantánea los tumores resecados, se pulverizaron y se almacenaron a -70°C antes de la lisis con NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, Hepes 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1,0%, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, Na_3VO_4 1 mM, Pefabloc 2 mM (Roche), y cóctel de inhibidores de proteasa completo (Roche). Se determinó el contenido en proteínas de los lisados usando el ensayo de BCA (Bio-Rad, Hercules, CA). Se realizó el análisis de inmunotransferencia de tipo Western para pERK con un anticuerpo de ratón frente a pERK (1:1000, Cell Signaling, Beverly, MA) y se incubó a 4°C durante la noche. Se evaluó el nivel de ERK total sondando de nuevo con anticuerpo frente a ERK total (Cell Signaling). Entonces se incubaron las membranas durante 1 hora a TA con IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano 1:5000 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Para la inmunoprecipitación para detectar FLT3, se incubaron cantidades iguales de proteínas (500 μ g para STAT5; 1000 μ g para FLT3) con anticuerpos frente a STAT5 o bien a STAT5 o bien a FLT3 humanas (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante la noche a 4°C y con proteína A-agarosa durante 2 horas a 4°C. Se midió la fosforilación de FLT3 o STAT5 sondando con un anticuerpo anti-fosfotirosina (anticuerpo anti-pFLT3 de Cell Signaling, y anticuerpo anti-pSTAT5 de Upstate). Se detectaron las proteínas usando quimioluminiscencia potenciada (ECL; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) y se visualizaron tras la exposición a película de Kodak. Se realizó densitometría de barrido para cuantificar las intensidades de banda. Para verificar las cargas iguales, se separaron las inmunotransferencias y se sondaron de nuevo con anticuerpos o bien anti-FLT3 (Santa Cruz Biotechnology) o bien anti-STAT5 (BD Biosciences) para medir la proteína FLT3 o STAT5 total, respectivamente. Se normalizó la cantidad de pFLT3, pERK o pSTAT5 para determinar los niveles de proteína FLT3, ERK o STAT5 totales, y en comparación con controles no tratados o vehículo.

Ensayos citométricos de flujo

Se trataron células MV4;11 con el compuesto 1 durante 3 horas en condiciones sin suero (durante la noche en medio OptiMEM). Para la detección de pSTAT5, se fijaron las células con formaldehído al 1%, y se permeabilizaron con metanol al 90% enfriado con hielo. Se incubaron las células permeabilizadas ($0,5 - 1 \times 10^6$) con anticuerpo anti-pSTAT5 (Cell Signaling) durante 30 minutos. Se usó IgG de conejo purificada (Oncogene, San Diego, CA) a la misma concentración como un control de isotipo. El anticuerpo secundario fue una IgG de cabra anti-conejo F(ab')₂ conjugada con PE (Jackson ImmunoResearch). Se almacenaron las muestras a 4°C en la oscuridad antes del análisis usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) para la tinción de pSTAT5 usando el software CellQuest (Becton Dickinson) y la MFI específica era la diferencia de la MFI del anticuerpo de control de isotipo.

Para el procesamiento de las células de médula ósea (MO) del modelo de injerto de ratón MV4;11, se purgaron los fémures con solución salina fría y los glóbulos rojos se lisaron con tampón de lisis FACS (Becton Dickinson). Se determinó el porcentaje de injerto de células leucémicas humanas en MO de ratón mediante la tinción con anticuerpo anti-HLA-A,B,C-FITC humano (frente al control con FITC-anticuerpo coincidente de isotipo) (BD Pharmingen).

ELISA de VEGF

Se cultivaron células MV4;11 en FBS al 10% que contenía medios con diversas concentraciones (0 - 1 μ M) del compuesto 1 durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes tras la centrifugación, y se midieron los niveles de VEGF mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se determinaron las concentraciones de proteína usando el ensayo de proteínas de BIO-RAD (Hercules, CA) y se normalizaron los resultados con respecto a la concentración de proteína.

Estudios de eficacia *in vivo*

Se obtuvieron ratones SCID-NOD hembras (4-6 semana de edad, 18-22 g) de Charles River (Wilmington, MA) y se aclimataron durante 1 semana en un recinto libre de patógenos antes de iniciar el estudio. Los animales recibieron alimento para roedores estéril y agua a voluntad y se alojaron en jaulas estériles con filtro superior con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos se realizaron según las directrices de la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International.

Modelo subcutáneo

Se realizaron pases de células MV4;11 y RS4;11 a partir de tumores subcutáneos (s.c.) en ratones SCID-NOD. Se reconstituyeron las células (5×10^6 células/ratón) con 50% de Matrigel (Becton Dickinson) y se implantaron por vía s.c. en el costado derecho de ratones SCIDNOD. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores tenían 200-1000 mm^3 , tal como se explicó en los diseños específicos del estudio. Los ratones se asignaron de manera aleatoria en cohortes (normalmente 10 ratones/grupo para los estudios de eficacia y 3-5 ratones/grupo para los estudios farmacodinámicos (PD)). Se administró el compuesto 1 como una disolución a través de una sonda nasogástrica oral. Se evaluaron los volúmenes y los pesos corporales 2-3 veces por semana. Se convirtieron las mediciones de calibración de los tumores en el volumen tumoral medio usando la fórmula: $1/2 (\text{longitud} \times [\text{anchura}]^2)$. Se comparó el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral (TGI) con el los ratones tratados con vehículo. Se definieron las tasas de respuesta como las respuestas completas RC (tumor no palpable) o las respuestas parciales RP (el 50-99% de encogimiento) en comparación con el volumen del tumor al inicio del tratamiento.

Modelo de injerto de médula ósea (MO) intravenoso

Se irradiaron ratones SCID-NOD (3 Gy) antes de la inyección en la vena de la cola de 1×10^7 células MV4;11 en 0,2 ml de solución salina. Los tratamientos con el compuesto 1 o vehículo se iniciaron 3 semanas tras la inoculación celular. Se monitorizaron diariamente los ratones y se sacrificaron cuando estaban moribundos o presentaban señales tempranas de pérdida de movilidad de las extremidades posteriores. Se calculó el aumento de la vida (ILS) de los ratones tratados como un aumento del porcentaje en el tiempo medio de supervivencia (MST) frente a los ratones control tratados con vehículo.

Modulación diana *in vivo*

Se clasificaron los tumores MV4;11 inyectados por vía s.c. en ratones SCID-NOD ($n=3$ ratones/grupo) en 300 mm^3 y se administraron vía oral los tratamientos que consistían en o bien el vehículo o bien el compuesto 1 a 10 mg/kg durante 5 días. Para caracterizar las propiedades PD del compuesto 1, se recogieron las muestras del tumor en diversos tiempos ($N=3$ ratones/ punto de tiempo) tras la dosificación del compuesto 1.

Inmunohistoquímica

Se colocaron los tumores resecados en formalina tamponada neutra al 10% durante la noche a TA, se transfirieron a etanol al 70% y se procesaron para introducirlos en parafina usando un procesador de tejidos Thermo Electron Excelsior (Pittsburgh, PA). Se descalcificaron las muestras óseas (fémur) (ProtocolTM, Fisher Diagnostics, Middletown, VA). Se cortaron los bloques de parafina a un espesor de 4 μ m y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio cargadas positivamente. Se tiñeron los tejidos usando una máquina portaobjetos automatizada Discovery (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Se trataron los portaobjetos con tampón citrato (pH 6,0) en un generador de vapor presurizado para recuperar el antígeno para la tinción de Ki-67, pERK y PARP, y se recuperó la caspasa-3 mediante el reactivo CC1 de Ventana. Los anticuerpos primarios usados eran Ki-67 (dilución 1:750, NovoCastra Laboratories, UK), pERK (dilución 1:100, Biosource, Camarillo, CA), anti-mitocondria humana (1:200, Chemicon, Temecula, CA), caspasa-3 escindida (1:200, Cell Signaling) y PARP escindido (1:100, Biosource). Los anticuerpos secundarios eran un anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo F (ab')₂, dilución 1:100 (Jackson InmunoResearch). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y entonces se montaron con un cubreobjetos. También se evaluó la morfología tisular general usando tinción con hematoxilina y eosina.

Análisis estadísticos

- 5 Se realizó la regresión lineal usando Microsoft Excel (Redmond, WA). Se usó la prueba de la t de Student para medir la significación estadística entre dos grupos de tratamiento. Se hicieron múltiples comparaciones usando análisis unidireccionales de variancia (ANOVA), y se realizaron pruebas posteriores que compararon los diferentes medios de tratamiento usando la prueba de Student-Newman Keul (SigmaStat, San Rafael, CA). Para los estudios de supervivencia, se usó la prueba de rangos logarítmicos para determinar la significación entre las curvas de supervivencia de los diversos grupos tratamiento frente a vehículo (Prism, San Diego, CA). Los ratones sacrificados con estados de salud normales a la terminación del estudio se consideraron supervivientes a largo plazo y se censuraron en este análisis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

RESULTADOS

- 10 El compuesto 1 demuestra potente inhibición de la actividad cinasa de FLT3

- 15 Se sometió a prueba la especificidad del compuesto 1 frente a diversos paneles de RTK usando ensayos de unión competitiva de ATP con enzimas purificadas tal como se describió anteriormente. Se encontró que el compuesto 1 es altamente potente frente a FLT3 (1 nM) con actividad nanomolar frente a c-KIT (2 nM), VEGFR1/2/3 (10 nM); FGFR1/3 (8 nM); PDGFR β (27 nM) y CSF-1R (36 nM) (véase la siguiente tabla). Para confirmar la selectividad frente a RTK de clase III, IV y V, se sometió a prueba el compuesto 1 frente a otras cinasas en las rutas de PI3K/Akt y MAPK(K) y se encontró que tiene actividad insignificante ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$) (véase la siguiente tabla).

Tabla. Actividad de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona frente a diversas RTK

RTK	CI_{50} (μM)
FLT3	0,001
c-KIT	0,002
CSF-1R	0,036
FGFR1	0,008
FGFR3	0,009
VEGFR1/Flt1	0,01
VEGFR2/Flk1	0,013
VEGFR3/Flt4	0,008
PDGFR β	0,027
PDGFR α	0,21
EGFR1	2
c-MET	>3
EphA2	4
TIE2	4
IGFR1, HER2, PI-3K, Akt1/3, Raf, ERK-1/2, MEK, p38- α,β,γ	>10

Los ensayos de RTK *in vitro* usados para preparar la tabla anterior se realizaron con diversas diluciones del compuesto 1 en presencia de enzimas purificadas y ATP tal como se describió anteriormente. Se incubaron los sustratos peptídicos fosforilados (1 μ M) con anticuerpos anti-fosfoespecíficos marcados con europio y se detectó el europio usando fluorescencia de resolución temporal.

5 Potentes efectos antiproliferativos del compuesto 1 sobre células MV4;11 (ITD DE FLT3)

Para determinar si la inhibición de FLT3 se traduce en la inhibición del crecimiento *in vitro*, se sometió a prueba la actividad del compuesto 1 frente a células MV4;11 y RS4;11 usando el ensayo de MTS. Se incubaron las células MV4;11 o RS4;11 (en presencia del ligando de FLT3) con diluciones en serie del compuesto 1. Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS tras un periodo de incubación de 72 horas. Se calcularon los valores de CE₅₀ usando regresión no lineal, y se definieron como la concentración necesaria para una reducción del 50% en la absorbancia de las células tratadas frente a las control no tratadas. El compuesto 1 inhibió potencialmente la proliferación de las células MV4;11 de una manera dependiente de la dosis con CE₅₀ = 13 nM. Aunque se observaron efectos similares dependientes de la concentración sobre la proliferación con las células RS4;11, éstas eran aproximadamente 24 veces menos sensibles al compuesto 1 (CE₅₀ = 315 nM). También se sometió a prueba el efecto antiproliferativo del compuesto 1 sobre células mutantes ITD de FLT3, MOLM13 y MOLM14 con concentraciones de CE₅₀ similares a las observadas con MV4;11 (CE₅₀ ~ 6 nM). Estos datos sugieren que el compuesto 1 es activo en células leucémicas tanto ITD como WT de FLT3, siendo el receptor constitutivamente activo más sensible a la inhibición.

Efectos *in vitro* del compuesto 1 sobre la señalización mediada por FLT3 en células leucémicas

20 Se investigó la actividad celular *in vitro* del compuesto 1 en dos líneas celulares leucémicas humanas MV4;11 y RS4;11 con el estado mutacional FLT3 de contraste (confirmado usando RT-PCR). En estos experimentos, se incubaron células MV4;11 (ITD) o RS4;11 (WT) privadas de suero con una concentración creciente del compuesto 1 durante 3 horas previas a la lisis celular. Se estimularon las células RS4;11 con el ligando de FLT3 (100 ng/ml) durante 15 minutos. Se inmunoprecipitaron los lisados celulares completos con anticuerpo anti-FLT3-humano, resueltos mediante SDS-PAGE. Las inmunotransferencias se sondaron con anticuerpo anti-fosfotirosina. También se separaron las membranas y se volvieron a sondar con anti-FLT3 para demostrar una carga igual de FLT3. Se notificaron los cambios en pFLT3 como el porcentaje con respecto al nivel inicial (sin tratamiento) usando densitometría. Las células MV4;11 tienen una mutación de duplicación en tandem interna (ITD) en el receptor FLT3, dando como resultado FLT3 constitutivamente activado. Levis M. *et al.*, Blood, 99: 3885-3891 (2002); O'Farrell A.M. *et al.*, Blood, 101:3597-3605 (2003). Esta activación da como resultado la autofosforilación de FLT3 en ausencia de estimulación de ligando exógena. Se trataron las células MV4;11 privadas de suero con el compuesto 1 durante 3 horas, y se determinaron los efectos directos sobre la activación del receptor FLT3 mediante el análisis de su estado de fosforilación. La exposición de las células MV4;11 a concentraciones crecientes del compuesto 1 inhibió potencialmente pFLT3 de una manera dependiente de la dosis con CE₅₀ entre 1-10 nM.

35 Mientras que las ITD de FLT3 son prevalentes en aproximadamente el 20% de los blastocitos de los pacientes con LMA, las leucemias más agudas expresan la WT de FLT3. También se investigaron los efectos del compuesto 1 sobre las células leucémicas RS4;11 (WT de FLT3) una vez que el ligando de FLT3 exógeno (100 ng/ml, 15 minutos) activara la fosforilación del receptor FLT3. Las células WT de FLT3 RS4;11 tienen bajos niveles basales de pFLT3 en ausencia de estimulación del ligando de FLT3. El tratamiento con el compuesto 1 disminuyó los niveles de pFLT3 en células RS4;11. Sin embargo, comparativamente, se requirieron concentraciones más grandes para la modulación de WT de FLT3 frente a ITD. Se obtuvo inhibición completa con concentraciones > 0,5 μ M.

El compuesto 1 modula ERK y STAT5, dianas posteriores de la inhibición de FLT3

45 Para caracterizar adicionalmente los efectos del compuesto 1 sobre la inhibición de FLT3, se investigó la modulación de dianas posteriores de FLT3, es decir, STAT5 y ERK, que son proteínas claves en la supervivencia y la proliferación celulares. Se trataron células MV4;11 con concentraciones crecientes del compuesto 1 durante 3 horas y se procesaron mediante citometría de flujo e inmunotransferencia de tipo Western para la detección de pERK y p-STAT5. Se notificaron los cambios en pERK o pSTAT5 como porcentaje con respecto al nivel inicial (sin tratamiento). En las células MV4;11, debido a la señalización activa de FLT3, las células tienen altos niveles basales de pERK y pSTAT5. El compuesto 1 inhibió la fosforilación de ERK y STAT5 de una manera dependiente de la dosis. Se observó la inhibición sustancial de pERK y pSTAT5 (>50%) a concentraciones > 0,1 μ M (citometría de flujo e inmunotransferencia de tipo Western). Los efectos inhibidores del compuesto 1 sobre pERK y pSTAT5 eran más potentes en MV4;11 en comparación con las células RS4;11 estimuladas con ligando de FLT3.

El compuesto 1 inhibe la producción de VEGF autocrina en células MV4;11 *in vitro*

Para abordar el efecto del compuesto 1 sobre la producción de VEGF *in vitro*, se realizó un ensayo ELISA sobre

sobrenadantes de cultivo de MV4;11. En estos experimentos, se cultivaron las células MV4;11 en FBS al 10% que contenía medio con concentraciones crecientes (0 - 1 μ M) del compuesto 1 durante 48 horas. En ausencia de tratamiento con el fármaco, las células MV4;11 secretan VEGF sustancial (180 pg/ml), mientras que el compuesto 1 inhibe la producción de VEGF de una manera dependiente de la dosis, con una CE_{50} entre 0,001 y 0,01 μ M y la inhibición completa a concentraciones > 0,5 μ M.

El compuesto 1 modula la señalización de FLT3 *in vivo*

Para examinar la modulación diana *in vivo*, se administró a ratones que portaban tumores MV4;11 (clasificados en 300 - 500 mm^3) el compuesto 1 (10 mg/kg/d) o vehículo durante 5 días. Se resecaron los tumores en el día 5 a las 4, 8, 24, y 48 h tras la dosis, se pulverizaron e inmediatamente se congelaron de manera instantánea (-70°C). Los tumores que se recogieron tras los puntos de tiempo seleccionados, se homogenizaron y se analizaron para determinar los niveles de pFLT3 y pSTAT5 mediante IP/inmunotransferencia de tipo Western. Para la modulación de pFLT3 o pSTAT5: Se inmunoprecipitaron los lisados de tumor con anticuerpo o bien anti-FLT3 o bien anti-STAT5 humano, resueltos mediante SDS-PAGE. Se sondaron las inmunotransferencias con anticuerpo anti-fosfotirosina apropiado. Se separaron las membranas y se volvieron a sondear con o bien anti-FLT3 o bien anti-STAT5 para la determinación de la proteína FLT3 o STAT5 total como controles de carga. Se observaron reducciones significativas en los niveles de pFLT3 y pSTAT5 ya a las 4 horas tras la dosis con o bien una dosis única o bien dosis múltiples del compuesto 1, sin efectos sobre la proteína FLT3 o STAT5 total. La fosforilación tanto de FLT3 como de STAT5 disminuyó relativamente con respecto al nivel inicial alcanzando una inhibición máxima de ~90% a 8 horas tras la dosis y permaneció inhibida durante 24 horas (~85% de inhibición). La fosfo-FLT3 se volvió cercana a los niveles iniciales, mientras que, p-STAT5 todavía estaba inhibida (~60% de inhibición) 48 horas tras la dosis. También se observaron disminuciones en los niveles de pERK, indicando un bloqueo de la señalización posterior de FLT3.

Estudios de eficacia *in vivo*

Efectos de respuesta a la dosis del compuesto 1 sobre tumores MV4;11 y RS4;11 *in vivo*

Para establecer si los efectos *in vitro* del compuesto 1 se correlacionan con la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, se examinó la eficacia del compuesto 1 frente a xenoinjertos de tumores MV4;11 o RS4;11 en ratones SCID-NOD. Se implantó en ratones por vía s.c. células tumorales y se iniciaron los tratamientos con el compuesto 1 cuando los tumores eran 200-300 mm^3 . En estudios de eficacia de la respuesta a la dosis, se administró por vía oral el compuesto 1 a un intervalo de dosis de 1 - 30 mg/kg/d para los tumores MV4;11, y de 10 - 150 mg/kg/d para los tumores RS4;11.

El compuesto 1 era altamente potente frente a tumores MV4;11, lo que revela un buen efecto dosis-respuesta con inhibición significativa del crecimiento tumoral a dosis > 5 mg/kg/d (figura 2). Las dosis de 30 mg/kg/d indujeron la regresión tumoral (9/10 respuestas tumorales), que consistió en pacientes que respondieron al tratamiento tanto de manera parcial como completa (1 RC, 8 RP). Se observó la inhibición moderada del crecimiento tumoral a 1 mg/kg/d (el 23%) tras 2 semanas de dosificación, y se identificó como la dosis mínima estadísticamente eficaz en este modelo ($p < 0,01$ frente al vehículo). En ratones que portaban tumores RS4;11, el tratamiento con el compuesto 1 dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral, sin embargo no se observaron regresiones (figura 3). Los efectos inhibidores del compuesto 1 eran más potentes frente a tumores MV4;11 en comparación con tumores RS4;11, definidos por una dosis mínima eficaz respectiva en cada modelo (día 8:100 mg/kg/d; 48% de TGI, $p < 0,01$ frente a tumores RS4;11 frente a 1 mg/kg/d; 23% de TGI, $p < 0,01$ frente a tumores MV4;11).

Los programas de dosis alterna del compuesto 1 son igualmente potentes

También se examinaron los efectos de dosis intermitentes y cíclicas del compuesto 1 frente a tumores de xenoinjerto MV4;11 (figura 4). Se administró por vía oral el compuesto 1 a 30 mg/kg diariamente, cada dos días (q.o.d.), o cíclicamente, 7 días sí/7 días no durante 2 ciclos (figura 4). De manera similar a la dosificación diaria, los regímenes de dosificación intermitente produjeron regresiones tumorales significativas dentro de los días de tratamiento con el fármaco (> al 94% de TGI). Los tres regímenes dieron como resultado actividad antitumoral equivalente (día 29, $p > 0,05$) y los números de respuestas observadas con q.o.d. (6 RP) y 7 sí/7 no (9 RP) fueron similares a las observadas con el tratamiento diario (1 RC, 9 RP).

El compuesto 1 es eficaz frente a tumores MV4;11 grandes

También se investigaron los efectos del compuesto 1 sobre tumores MV4;11 grandes de diversos tamaños; 300, 500 o 1000 mm^3 . El tratamiento con el compuesto 1 (30 mg/kg/d) indujo regresión significativa en todos los tumores MV4;11 que era independientemente de los tamaños tumorales iniciales al inicio del tratamiento (figura 5). Las regresiones tumorales eran evidentes en el plazo de 3-5 días de tratamiento con el fármaco. Todos los tumores tratados respondieron (n=27), siendo un 15% de respuestas completas y un 70% de respuestas parciales. El 15%

restante eran respuestas minoritarias o permanecieron estables. La dosificación se interrumpió tras 50 días. Ningún tumor volvió a crecer durante el tratamiento de 50 días, lo que indica que no se desarrolló resistencia frente al compuesto 1. También se examinó la duración de las respuestas tras la interrupción del tratamiento. Una RC y aproximadamente el 50% de las RP duraron 40 días tras el cese de la dosificación del compuesto 1. Se volvieron a tratar diez tumores que volvieron a crecer (hasta 600-2000 mm³) con 30 mg/kg/d del compuesto 1 comenzando en el día 90 del (40 días tras el cese de la dosificación) y se continuó durante 60 días. Todos los tumores respondieron al segundo ciclo del compuesto 1 (2 RC, 8 RP), indicando claramente una falta de resistencia del tumor al compuesto 1.

Evaluación histológica de la actividad biológica *in vivo*

Además del volumen del tumor y los criterios de valoración de la modulación diana, se usaron lecturas inmunohistoquímicas como indicadores de la actividad del fármaco. Se evaluó la apoptosis/necrosis tumoral y la inhibición de la proliferación celular en tumores MV4;11 o RS4;11 en ratones SCID-NOD tratados con 30 mg/kg de 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona (compuesto 1) usando análisis histológico e inmunohistoquímico. En este estudio, se trataron ratones SCID-NOD que portaban tumores MV4;11 s.c. (n= 3-5 /grupo) con o bien el vehículo o bien 30 mg/kg/d del compuesto 1 durante 5 días. Se resecaron los tumores en los días 2-5. Los tumores introducidos en parafina o bien se tiñeron con hematoxilina y eosina o bien se inmunotiñeron con Ki67 (marcador de proliferación), pERK (marcador farmacodinámico mecanístico), caspasa-3 escindida (para apoptosis) o PARP (para apoptosis) (con contratiñición con hematoxilina). Se investigaron los efectos temporales de la administración del compuesto 1 (30 mg/kg/d) en tumores MV4;11 tras 1 ó 5 dosis. La evaluación morfológica usando tinción con H&E, reveló que los tumores tratados con vehículo consistieron de células tumorales MV4;11 con una marcada hiper celularidad indicativa de hiperplasia mieloide. En el grupo tratado con vehículo, las células tumorales fuertemente teñidas con Ki67 indicaron una composición tumoral de células altamente proliferativas. Hacia las 24 horas tras la dosificación, los tumores tratados con el compuesto 1 mostraron una reducción en células densamente empaquetadas y consistieron de áreas poco densas de células apoptóticas/necróticas (día 1). La áreas de apoptosis/necrosis eran más pronunciadas tras 5 dosis con áreas significativas de tumor no viable coincidente con tinción con Ki67 reducida. Se confirmó la modulación diana *in vivo* a partir de la tinción inmunohistoquímica de pERK. Fosfo-ERK disminuyó significativamente en los tumores tratados con el compuesto 1 durante el periodo de dosificación de 5 días corroborando el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de pERK en tumores. La apoptosis inducida por el compuesto 1, se evidenció a partir de tinción de PARP escidida y la caspasa-3 activada aumentada en los tumores en el día 5 en comparación con los controles tratados con vehículo. También se examinó la inmunohistoquímica de los tumores RS4;11 tras el tratamiento con 30 mg/kg de tratamiento con el compuesto 1. Se trataron los tumores RS4;11 (n= 3-5/grupo) con o bien vehículo o bien 30 mg/kg/d del compuesto 1.. Se resecaron los tumores en los días 9. Los tumores introducidos en parafina o bien se tiñeron con hematoxilina y eosina o bien se inmunotiñeron con Ki67, o pERK (tal como se describió anteriormente). Los efectos similares de celularidad y proliferación disminuidas así como pERK reducida fueron evidentes en los tumores RS4;11 tratados con el compuesto 1 (30 mg/kg/d).

Adicionalmente, se evaluó la histología de los tumores que se definieron como una respuesta parcial (>50% de la inhibición tumoral) o completa (sin masa tumoral palpable). En estos estudios, se trataron los ratones SCID-NOD que portaban tumores MV4;11 s.c. (n= 3-5 /grupo) con o bien vehículo o bien 30 mg/kg/d del compuesto 1. Se resecaron los tumores tratados con vehículo en el día 15 y se resecaron los tumores tratados con el compuesto 1 en el día 89 (50 dosis diarias del compuesto 1 + 39 días sin tratamiento). Los tumores introducidos en parafina o bien se tiñeron con hematoxilina y eosina o bien se inmunotiñeron con Ki67 (con contratiñición con hematoxilina). Los pacientes que respondieron al tratamiento quedaron desprovistos completamente de células tumorales MV4;11, presentando sólo restos de necrosis y/o tejido cicatricial. En las respuestas parciales, se observaron cavidades de células tumorales de proliferación positiva para Ki67 en la periferia de los tumores.

El compuesto 1 prolonga el tiempo de supervivencia de ratones que portan células leucémicas humanas diseminadas

Se sometió a prueba la eficacia del compuesto 1 en el modelo leucémico MV4;11 en el que se inocularon las células en la vena de la cola de ratones SCID-NOD irradiados (figura 6). En este modelo, las células MV4;11 se diseminan por la médula ósea (MO), imitando patológicamente un patrón de enfermedad similar a la leucemia humana. Se inyectaron células MV4;11 a los ratones en el día 1 y se iniciaron los tratamientos con el compuesto 1 (20 mg/kg, diariamente o 7 días sí/7 días no, n=10-12/grupo) en el día 23, tras injertar células MV4;11 en la MO. En los ratones control (tratados con vehículo) normalmente se provoca la parálisis en las extremidades posteriores como consecuencia de las células tumorales que se infiltran en la MO, con un tiempo medio de supervivencia (MST) de 51 días (figura 6). En los estudios de supervivencia, el tratamiento diario con el compuesto 1 (día 23-100) retardó significativamente el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (MST = 134 días) en comparación con los controles tratados con vehículo (MST = 51 días) (p < 0,0001), lo que demuestra un aumento del 163% de la vida (ILS) (figura 6). Sorprendentemente, con el tratamiento con el compuesto 1 diario, 4 ratones eran supervivientes a largo plazo (MST > 160 días). Se usaron el análisis histológico y citometría de flujo para cuantificar el % de

injeración de células MV4;11 en la MO. En los análisis de citometría de flujo, se identificaron células MV4;11 humanas en la MO de ratón con un anticuerpo anti-HLA-A,B,C humano que se une a un epítipo en el MHC I humano. En los ratones tratados con vehículo, aproximadamente el 2-19% de las células de MO aisladas totales consistió de células MV4;11 injertadas (día 51). Esto también se corroboró mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a mitocondria humana que tiñe las células MV4;11 identificando las células humanas en la matriz de MO de ratón. El compuesto 1 dosificado diariamente (20 mg/kg) a lo largo de 25 días redujo significativamente la carga leucémica (< 1% de células MV4;11 en la MO) frente al tratamiento con vehículo. De manera interesante, los ratones supervivientes tras el tratamiento con el compuesto 1 no mostraron inmunohistoquímicamente ninguna evidencia de células tumorales (observada como una ausencia de células positivas para anti-mitocondria humana en el día 167) en la MO y se definieron como “curados”. La dosificación cíclica del compuesto 1 (7 días sí/7 días no, 5 ciclos) también dio como resultado tiempos de supervivencia significativamente aumentados (MST = 118 días, 131% de ILS frente al vehículo, $p = 0,0001$), pero no fue tan eficaz como el régimen diario ($p = 0,007$, figura 6).

Eficacia del compuesto 1 en el tratamiento de líneas celulares de cáncer de próstata

Debido a que el compuesto 1 tiene una selectividad de cinasa de múltiples dianas frente a tirosina cinasas receptoras de clase III, IV, y V (RTK), se examinó la actividad del compuesto 1 en un modelo metastásico de cáncer de próstata. Se evaluó la eficacia antitumoral del compuesto 1 usando tumores PC-3M que expresan las RTK VEGFR y FGFR clave que se inhiben por el compuesto 1. Se ha demostrado que las células PC-3M metastatizan el hueso, y por tanto, se usó este modelo para investigar la actividad del compuesto 1 en un modelo de xenoinjerto metastásico experimental de cáncer de próstata humano en ratones atímicos.

Líneas celulares. Se obtuvo la línea celular PC-3M metastásica de próstata humana que no expresa p53, del PTEN, VEGFR, FGFR y transfectadas de manera estable con un constructo de luciferasa según un acuerdo de licencia con Xenogen.

Estudios de eficacia *in vivo*. Se obtuvieron ratones atímicos machos (nu/nu) (4-6 semana de edad, 18-22 g) de Charles River (Wilmington, MA) y se aclimataron durante 1 semana en un recinto libre de patógenos antes del inicio del estudio. Los animales recibieron alimento para roedor estéril y agua a voluntad y se alojaron en jaulas estériles con filtro superior con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos se realizaron según las directrices de la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International.

Modelo metastásico de hueso PC-3M luc. Se inyectaron las células PC-3M-luc de la línea celular de cáncer de próstata humana ($1,5 \times 10^6$ células) transfectadas de manera estable con un constructo de luciferasa por medio de inyecciones intracardiacas. Se usó la obtención de imágenes de bioluminiscencia (Sistema de obtención imágenes IVIS® de Xenogen) para monitorizar de manera no invasiva el crecimiento *in vivo* y la metástasis de los tumores PC-3M-luc tras la inoculación celular. Casi todos los animales a los que se inyectaron células tumorales PC-3M-luc desarrollaron lesiones en la próstata, que se ubicaron principalmente en el fémur y las mandíbulas. Se iniciaron los tratamientos con vehículo, compuesto 1 o taxol ($n=7$ /grupo) 4 semanas tras la inoculación celular (día 0 del estudio). Se monitorizaron los ratones diariamente y se sacrificaron cuando estaban moribundos.

Información de los grupos.

Se inició la dosificación 4 semanas tras la inoculación celular (día 0 del estudio)

1. Vehículo ($n=8$)

2. Compuesto 1, 50 mg/kg, v.o., diariamente ($n=7$)

3. Taxol, 15 mg/kg, i.p., 3 veces por semana ($n=7$)

Criterios de valoración. Eficacia (obtención de imágenes en tiempo real de tumores *in vivo* usando el sistema de obtención de imágenes IVI® de Xenogen).

Inmunohistoquímica. Se descalcificaron las muestras óseas (fémures, mandíbulas) (ProtocolTM, Fisher Diagnostics, Middletown, VA). Se cortaron los bloques de parafina hasta 4 mm de espesor y se colocaron sobre portaojetos de vidrio cargados positivamente. Se tiñeron los tejidos con hematoxilina y eosina para determinar la morfología tisular general y la identificación de células PC-3M en el hueso.

Los ratones machos atímicos inoculados con células PC-3M-luc por medio de la inyección intracardiaca mostraron crecimiento diseminado de las células PC-3M tras la inoculación intracardiaca a tal como se detectó mediante la obtención de imágenes de cuerpo completo en serie de las células tumorales PC-3M-luc *in vivo* y las evaluaciones histológicas (figura 7). A las cuatro semanas tras la inoculación de las células PC-3M en los ratones atímicos, la

5 obtención imágenes de cuerpo completo demostró el desarrollo de crecimiento celular y lesiones metastásicas ubicadas principalmente en las áreas abdominales y de la cabeza, lo que se confirmó mediante la evaluación histológica de que las células PC-3M metastatizan los hueso (fémur y mandíbula). En algunos ratones, también se detectaron células tumorales en las áreas torácicas, que son posiblemente algunas células residuales tras la inoculación intracardiaca.

10 Se inició el tratamiento con el compuesto 1 cuatro semanas tras la inoculación celular una vez que los tumores habían metastatizado al hueso (día 0). También se confirmó la presencia de tumores en el hueso mediante la obtención de imágenes de cuerpo completo de los ratones. Se administró por vía oral el compuesto 1 a una dosis de 50 mg/kg/día y se demostró una tendencia a inhibir el crecimiento metastásico de las células tumorales PC-3M luc en ratones atímicos en comparación con el tratamiento con vehículo tal como se determinó de la exploración en serie de ratones. Los ratones tratados con el compuesto 1 mostraron una intensidad media de fotones disminuida (inhibición) en comparación con los ratones tratados con vehículo en los días 0, 8 y 15/18. También se evaluó la inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con compuesto 1 usando la inhibición media de recuentos de fotones (figura 7). El tratamiento diario con el compuesto 1 (50 mg/kg/d) también era más eficaz que el tratamiento con taxol (15 mg/kg) tal como se muestra en la figura 7. No se observó ninguna diferencia en la eficacia del tratamiento entre el tratamiento con taxol y el tratamiento con vehículo (figura 7).

20 Resumen de los resultados. Se sometió a prueba la eficacia del compuesto 1 en el tratamiento de un tumor sólido que ha metastatizado en la médula ósea. En este modelo, se inocularon por vía intracardiaca a ratones atímicos con células PC-3M-luc. Las células PC-3M-luc son una línea celular de cáncer de próstata humana que se ha transfectado de manera estable con luciferasa. Tras la inoculación, se diseminaron las células PC-3-luc en múltiples órganos incluyendo el hueso. Se visualizaron las células tumorales diseminadas usando un equipo de obtención de imágenes *in vivo* disponible comercialmente se Xenogen, Corp.

25 Se inocularon los ratones atímicos con células PC-3M-Luc por vía intracardiaca con $1,5 \times 10^6$ células: Cuatro semanas tras la inoculación, se inició la dosificación (día 0) con vehículo (n=8), compuesto 1 a 50 mg/kg, v.o., diariamente (n=7), y taxol a 15 mg/kg, i.p., tres veces por semana, (n=7). Se adquirieron las líneas celulares PC-3M-luc de Xenogen y se obtuvieron imágenes de los ratones usando el sistema de obtención imágenes de IVIS® de Xenogen.

30 En los ratones tratados con el compuesto 1, los ratones mostraron una tendencia de recuento de fotones disminuida con respecto a los ratones tratados con vehículo y taxol. El recuento de fotones medio y un gráfico generado de las áreas de la cabeza y las patas de los ratones se muestran en la figura 7. Este experimento establece que el tratamiento con el compuesto 1 inhibe potencialmente el crecimiento de células PC-3M-luc que se han diseminado al hueso.

Eficacia del compuesto 1 en el modelo de tumor de mama 4T1 murino

35 El siguiente estudio evaluó diariamente la dosificación oral del compuesto 1 en el modelo de tumor de mama 4T1 murino metastásico espontáneo.

40 Se implantaron por vía subcutánea en ratones BALB/c hembra, de 9 semanas de edad (Charles River, Wilmington, MA con $2,5 \times 10^5$ células 4T1 (células derivadas de un nódulo de hígado metastásico) en el costado derecho. El tratamiento comenzó 13 días después cuando el volumen tumoral medio era de 140 mm^3 . Esto se designó como el día 1 del estudio. Se formuló el compuesto 1 como una disolución en agua purificada y se administró mediante sonda nasogástrica oral una vez al día durante 17 días.

Los grupos de tratamiento incluyeron, (n=10/grupo): vehículo (agua); cinco grupos de dosis del compuesto a 10, 30, 60, 100 y 150 mg/kg.

45 Los criterios de valoración del estudio incluyeron el crecimiento tumoral, las observaciones de los animales y la enumeración de las metástasis de pulmones e hígado. Se evaluaron las comparaciones por emparejamiento de los grupos de tratamiento frente a vehículo usando la prueba de la t de Student. Se compararon las diferencias entre los grupos de tratamiento usando una ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis) seguido por el método de Dunn para múltiples comparaciones por emparejamiento. Se terminó el estudio en el día 18 basándose en el volumen del tumor de grupo de vehículo.

50 Resumen de los resultados. El crecimiento tumoral primario se inhibió de manera estadísticamente significativa en todos los grupos excepto en los grupos de dosis de 10 mg/kg a los 4 días tras el inicio del tratamiento. La inhibición del crecimiento tumoral máxima para la dosis de 10, 30, 60, 1,00 y 150 mg/kg era del 32, 45, 50, 74 y 82%, respectivamente (figura 25, tabla X). Una comparación entre los grupos reveló las diferencias ($p < 0,05$) entre las dosis de 10, 30 y 60 mg/kg frente el nivel de dosis de 150 mg/kg y entre los grupos de 10 y 100 mg/kg.

5 Se enumeraron las metástasis de pulmón e hígado mediante inspección visual en los tejidos extraídos en el día 18. Los ratones control tratados con vehículo no desarrollaron tumores en los pulmones en la medida observada en estudios previos (disminución en ~50%) lo que influyó en las comparaciones estadísticas. Se redujeron las metástasis de pulmón mediante la administración del compuesto 1 frente al vehículo, específicamente: en el grupo de dosis de 150 mg/kg, en un 91% y los tratamientos de 30, 60 y 100 mg/kg redujeron el número de nódulos tumorales de hígado en $\geq 77\%$ frente a los controles (tabla Y).

Tabla X. Resumen de la inhibición del crecimiento tumoral primario de 4T1 mediante el compuesto 1

Dosis del compuesto 1	Volumen tumoral medio (mm ³) día 18	DE	Tratado/Control día 18	% de inhibición máx. (día de estudio)	Valor de p frente al vehículo
vehículo (n=9)	2248	780			
10 mg/kg (n=8)	1798	513	0,80	32 (d 11)	0,187
30 mg/kg (n=10)	1246	318	0,55	45 (d 18)	0,002
60 mg/kg (n=10)	1248	295	0,56	50 (d 11)	0,002
100 mg/kg (n=10)	624	184	0,28	74 (d 14)	<0,001
150 mg/kg (n=9)	402	95	0,18	82 (d 18)	<0,001

10 Tabla Y. Eficacia del compuesto 1 sobre la metástasis de pulmón e hígado espontáneo 4T1 tras 17 días de dosificación

Dosis del compuesto 1	a) Metástasis de hígado				b) Metástasis de pulmón			
	Incidencia	N.º de Metástasis Media \pm DE	% de inhibición frente al vehículo	Valores de p frente al vehículo	Incidenca	N.º de Metástasis Media \pm DE	% de inhibición frente al vehículo	Valores de p frente al vehículo
Vehículo (agua) (n=9)	8/9	18 \pm 15	n/a	n/d	9/9	27 \pm 14	n/d	n/d
10 mg/kg (n=8)	7/8	22 \pm 32	0	0,810	8/8	36 \pm 32	0	0,926
30 mg/kg (n=10)	6/10	3 \pm 4	83	0,014	10/10	26 \pm 26	0	0,926
60 mg/kg (n=10)	5/10	1 \pm 1	94	0,002	10/10	24 \pm 11	11	0,606
100 mg/kg (n=10)	1/10	4 \pm 13	77	0,010	10/10	24 \pm 30	13	0,756
150 mg/kg (n=9)	0/9	0 \pm 0	100	0,002	5/10	2 \pm 3	91	<0,001

15 En resumen, se confirmó la eficacia de la dosificación oral diaria del compuesto en el modelo de tumor de mama 4T1 murino en este experimento. Se observó la inhibición del crecimiento tumoral primario significativa tras 4 días de tratamiento. Las dosis del compuesto 1 de 30, 60, 100 y 150 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral primario en un 45%, 50%, 74% y 82%, respectivamente. El tratamiento con el compuesto 1 dio como resultado la inhibición

significativa de las metástasis espontáneas de pulmón e hígado. Se inhibió completamente el número de metástasis de hígado mediante el nivel de dosis de 150 mg/kg y se redujo significativamente a las dosis de 30, 60 y 100 mg/kg. Se redujeron las metástasis de pulmón con significación estadística (91% de inhibición) al nivel de dosis de 150 mg/kg.

5 Discusión

Las rutas de señalización de cinasa intracelulares aberrantes de dirigidas implicadas en la proliferación de células tumorales pueden alterar los procesos celulares y provocar la inhibición del crecimiento tumoral. Esto se ha ejemplificado mediante la aprobación de dos agentes dirigidos a moléculas pequeñas imatinib (Gleevec) en LMC (Bcr-Abl) y tumores del estroma gastrointestinal (c-KIT) y gefitinib (Irressa) en cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico (EGFR) o avanzado que no responde al tratamiento. Druker B.J. *Oncogene*, 21:8541-8546 (2002); Giaccone G. *Clin Cancer Res.* 10:4233S-4237S (2004). Ambos compuestos se dirigen a defectos moleculares específicos en las células tumorales y este éxito ha impulsado la investigación sobre terapias dirigidas moleculares a otras cinasas oncogénicas, incluyendo FLT3 15,20-23. Las mutaciones en el gen de FLT3 son las alteraciones genéticas más comunes en LMA, donde casi el 35% de los pacientes albergan mutaciones de activación. Se ha demostrado que las mutaciones de FLT3 confieren un mal pronóstico clínico implicando así a FLT3 como una diana terapéutica en LMA. Thiede C. *et al.*, *Blood*, 99:4326-4335 (2002); Schnittger S. *et al.*, *Blood*, 2002;100:59-66 (2002).

El compuesto 1 es un inhibidor de cinasa multidirigido con potencia nanomolar frente a RTK de clase III, IV y V implicadas en la proliferación tumoral y la angiogénesis. Los ensayos de cinasa bioquímicos demuestran que el compuesto 1 tiene una potente actividad frente a FLT3 (CI₅₀ de 1 nM). La actividad del compuesto 1 en dos líneas celulares leucémicas se caracterizó con un estado de FLT3 de contraste, MV4;11 (ITD de FLT3) y RS4;11 (WT de FLT3). Se demostró que el compuesto 1 reduce la fosforilación de FLT3 de una manera dependiente de la dosis, confirmando la actividad molecular en las células. El compuesto 1 bloqueó *in vitro* las moléculas de señalización posterior en las rutas de MAPK y STAT5 mitogénicas, ambas reguladoras clave en las rutas de proliferación celular. Resulta interesante que la actividad sobre la modulación diana de FLT3 era más pronunciada en las células MV4;11 que en las células RS4;11, como lo eran los efectos del compuesto 1 en los ensayos de citotoxicidad/proliferación celular. Se han notificado efectos diferenciales similares frente a FLT3-ITD y FLT3 de tipo natural para otros inhibidores de FLT3. Se puede concluir que las células MV4;11 en ITD de FLT3 tienen señales constitutivamente activas (Ras, STAT5) que impulsan la proliferación celular, y difieren de las células (RS4;11) en WT de FLT3 que puede mantener el crecimiento independientemente de la activación de FLT3 y/o pueden basarse en otras rutas oncogénicas. Minami Y. *et al.*, *Blood*, 102:2969-2975 (2003); Kiyoi H. *et al.*, *Oncogene*, 21:2555-2563 (2002); Spiekermann K. *et al.*, *Clin Cancer Res.* 9:2140-2150 (2003).

Los resultados de los estudios *in vivo* demostraron que el compuesto 1 tiene una potente actividad frente a modelos de leucemia tanto de tumor sólido como de MO diseminada. La actividad molecular del compuesto 1 en modelos preclínicos se abordó usando criterios de valoración PD para estudiar el grado y la duración de la modulación diana. Se demostró que el compuesto 1 regulaba sustancialmente por disminución tanto pFLT3 como pERK en tumores MV4;11. Se observó modulación diana (pFLT3) a las 4 horas y se mantuvo en tumores hasta 24 horas tras una dosis única o múltiples dosis del compuesto 1. Los efectos biológicos también evidenciaban la histopatología tumoral, donde se observaron respuestas de pERK, proliferación y apoptosis disminuidas en tumores en el plazo de 1-2 días de tratamiento con el fármaco. En xenoinjertos de tumores sólidos de MV4;11, las regresiones tumorales también eran pronunciadas en el plazo de días de tratamiento con el fármaco. Es posible que los efectos inhibidores potentes del compuesto 1 en el modelo de MV4;11 puedan surgir de la inhibición directa de FLT3 en combinación con la inhibición de otras RTK. Los datos (RT-PCR, no mostrados) indican que las células MV4;11 también expresan VEGFR1, cKIT, PDGFR β , FGFR1, y CSF-1R, todas RTK inhibidas potencialmente por el compuesto 1. El compuesto 1 tiene actividad <10 nM frente a las cinasas VEGF1/2/3, y los datos demuestran claramente que el compuesto 1 puede inhibir los niveles autocrinos de VEGF en cultivos de MV4;11 *in vitro*. La inhibición autocrina o paracrina *in vivo* de VEGF o FGF secretados por células tumorales o células estromales tumorales (incluyendo células endoteliales) puede inhibir la proliferación y la supervivencia de estas células. Ferrara N. *et al.*, *Nat Med.*, 9:669-676 (2003); Compagni A. *et al.*, *Cancer Res.* 60:7163-7169 (2000); Carmeliet P. *Nat Med.*, 9:653-660 (2003). La actividad adicional del compuesto 1 en tumores sólidos puede surgir de sus efectos potentes frente a PDGFR β afectando a la maduración e inclusión de pericitos de vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Carmeliet P. *Nat. Med.* 9:653-660 (2003); Ostman A. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 15:275-286 (2004). En el modelo de MO de LMA, se demostró que el compuesto 1 mejoraba la supervivencia de ratones y en algunas enfermedades erradicadas de ratones. Esto representa el potencial del compuesto 1 para erradicar tanto blastocitos circulantes como enfermedad de la MO mediante efectos antiproliferativos directos o la regulación de la angiogénesis de médula ósea, que puede desempeñar un papel en la supervivencia de los blastocitos. Carow C.E. *et al.*, *Blood*, 87:1089-1096 (1996); Drexler H.G. *Leukemia*, 10:588-599 (1996).

Basándose en la inhibición diana y en la farmacología del compuesto 1, se estudiaron programas de dosis intermitentes y cíclicos del compuesto 1. Los programas de dosificación alternos del compuesto 1 demostraron

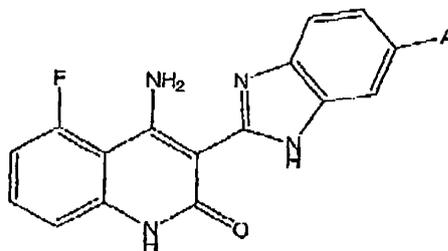
actividad similar en comparación con las dosis diarias del compuesto 1, lo que sugiere el potencial para regímenes de dosificación flexibles en la clínica. Múltiples dosis del compuesto 1 podían de inhibir de manera continua el crecimiento de los tumores y se encontró que cualquier tumor recurrente tras el cese del tratamiento era igualmente sensible al tratamiento de nuevo con el fármaco. Estos hallazgos son relevantes si se traducen en la práctica clínica, ya que algunos pacientes con LMA han mostrado recidiva en el tratamiento con inhibidores de cinasa a pesar del tratamiento continuado. Fiedler W. *et al.*, *Blood*, (2004); Cools J. *et al.*, *Cancer Res.* 64:6385-6389 (2004). Se ha demostrado que múltiples mecanismos incluyendo metabolismo o eflujo celular (por medio de la expresión de transportadores del fármaco tales como P-glicoproteína), o mutaciones en los dominios de unión a ATP de los sitios activos de la enzima que interfieren con la unión del fármaco están correlacionados con la resistencia a los inhibidores de cinasa. Bagrintseva K. *et al.*, *Blood*, 103:2266-2275 (2004); Grundler R. *et al.*, *Blood*, 102:646-651 (2003). El compuesto 1 no es un sustrato de P-GP, y las respuestas duraderas durante todo el transcurso del tratamiento con el fármaco pueden implicar que puede evitarse el desarrollo de resistencia con el compuesto 1.

El desarrollo clínico de inhibidores de FLT3 (SU11248 PKC412, CEP-701, MLN518) para LMA todavía está en las primeras fases. O'Farrell A.M. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 9:5465-5476 (2003); Fiedler W. *et al.*, *Blood*, (2004); Stone R.M. *et al.*, *Ann Hematol.* 83 Suppl 1:S89-90 (2004); Smith B.D. *et al.*, *Blood*, 103:3669-3676 (2004); DeAngelo D.J. *et al.*, *Blood*, 102:65a (2003). La selección de terapias con agentes individuales no han producido aún respuestas significativas, y el desarrollo clínico futuro de inhibidores de FLT3 en LMA pueden depender de la combinación de estos agentes con o bien fármacos citotóxicos o bien otros agentes dirigidos moleculares. Los datos notificados en el presente documento para el compuesto 1, un inhibidor de FLT3 potente con actividad adicional sobre RTK que se sabe que desempeña papeles en la patogénesis de LMA, garantiza su evaluación clínica.

Otros compuestos de estructura I tal como los compuestos de estructura IB, e IC se prepararon tal como se describió anteriormente. Se llevaron a cabo los estudios que usan estos compuestos usando la metodología descrita anteriormente para el 4-amino-5-fluoro-3-[6-(4-metilpiperazin-1-il)-1H-bencimidazol-2-il]quinolin-2(1H)-ona. Estos estudios demostrarán que estos compuestos también son útiles en el tratamiento de tumores metastatizados incluyendo tumores hematológicos, en ratones, seres humanos, y otros sujetos mamíferos.

REIVINDICACIONES

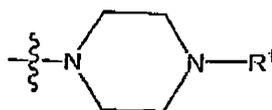
1. Uso de un compuesto de estructura I, un tautómero del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o una mezcla de los mismos, en la preparación de un medicamento para aliviar los síntomas de, o detener la progresión de mieloma múltiple en un sujeto que tiene un tumor de mieloma múltiple metastatizado,



I

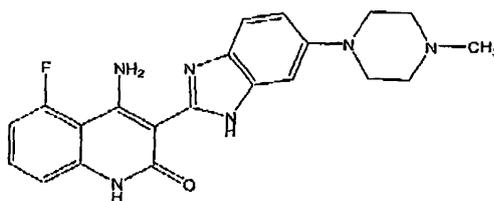
en la que,

A es un grupo que tiene una de la siguiente estructura:



- 10 en la que, R¹ se selecciona de grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, y en el que además, se inhibe el crecimiento del tumor de mieloma múltiple metastatizado en el sujeto tras la administración del compuesto de estructura I, el tautómero del compuesto, la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, la sal farmacéuticamente aceptable del tautómero, o la mezcla de los mismos al sujeto.

- 15 2. Uso según la reivindicación 1, en el que R¹ es un grupo metilo, y el compuesto de estructura I tiene la estructura IA.



IA

3. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende además un segundo agente.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que se usa la sal de lactato del compuesto de estructura I o el tautómero del mismo para preparar el medicamento.
- 20 5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto es un paciente con mieloma múltiple con una translocación cromosómica t(4;14).
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el mieloma múltiple expresa el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos.
- 25 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el mieloma múltiple ha metastatizado en un hueso del paciente.

8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto es un paciente con mieloma múltiple, y el paciente es un ser humano.
9. Uso según la reivindicación 3, en el que el segundo agente es para el tratamiento de la osteoporosis.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el segundo agente es un bisfosfonato.
- 5 11. Uso según la reivindicación 3, en el que el segundo agente es un agente anticancerígeno.

FIGURA 1

El tratamiento con el compuesto 1 demostró un recuento medio de fotones significativamente menor en comparación con el tratamiento con vehículo

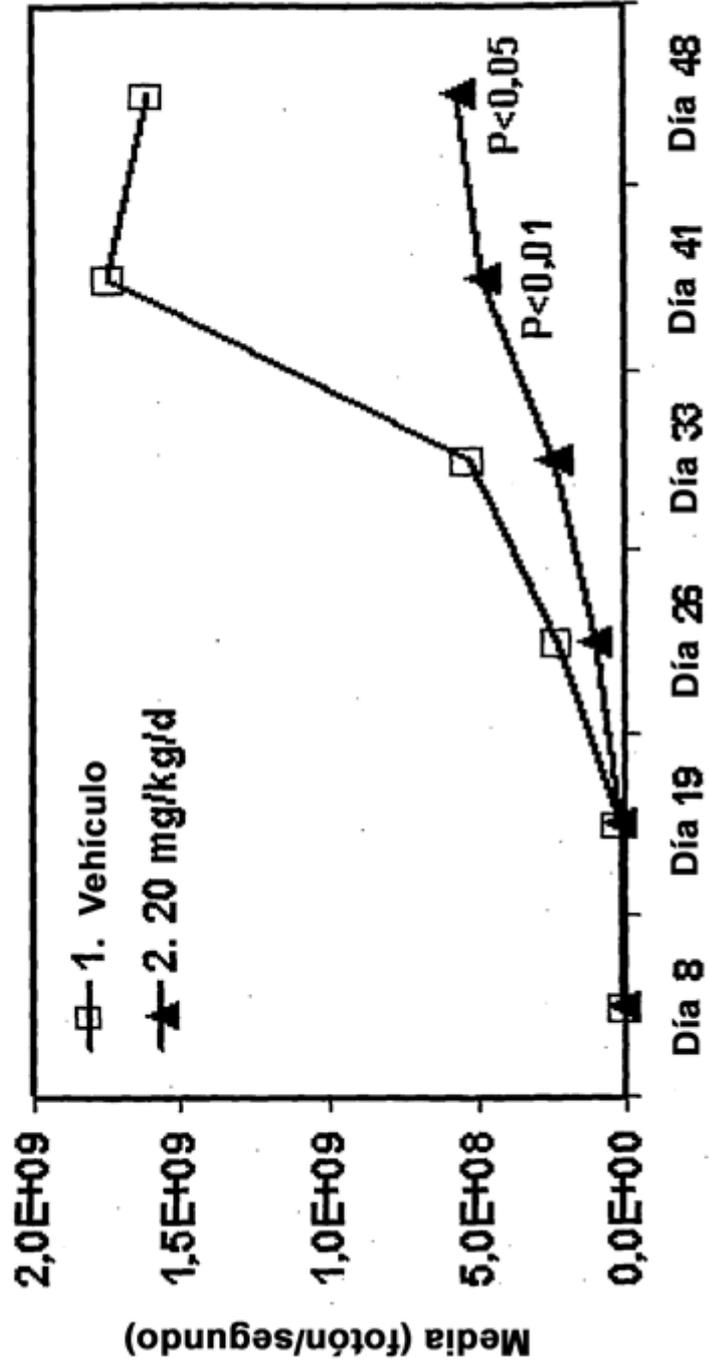


FIGURA 2

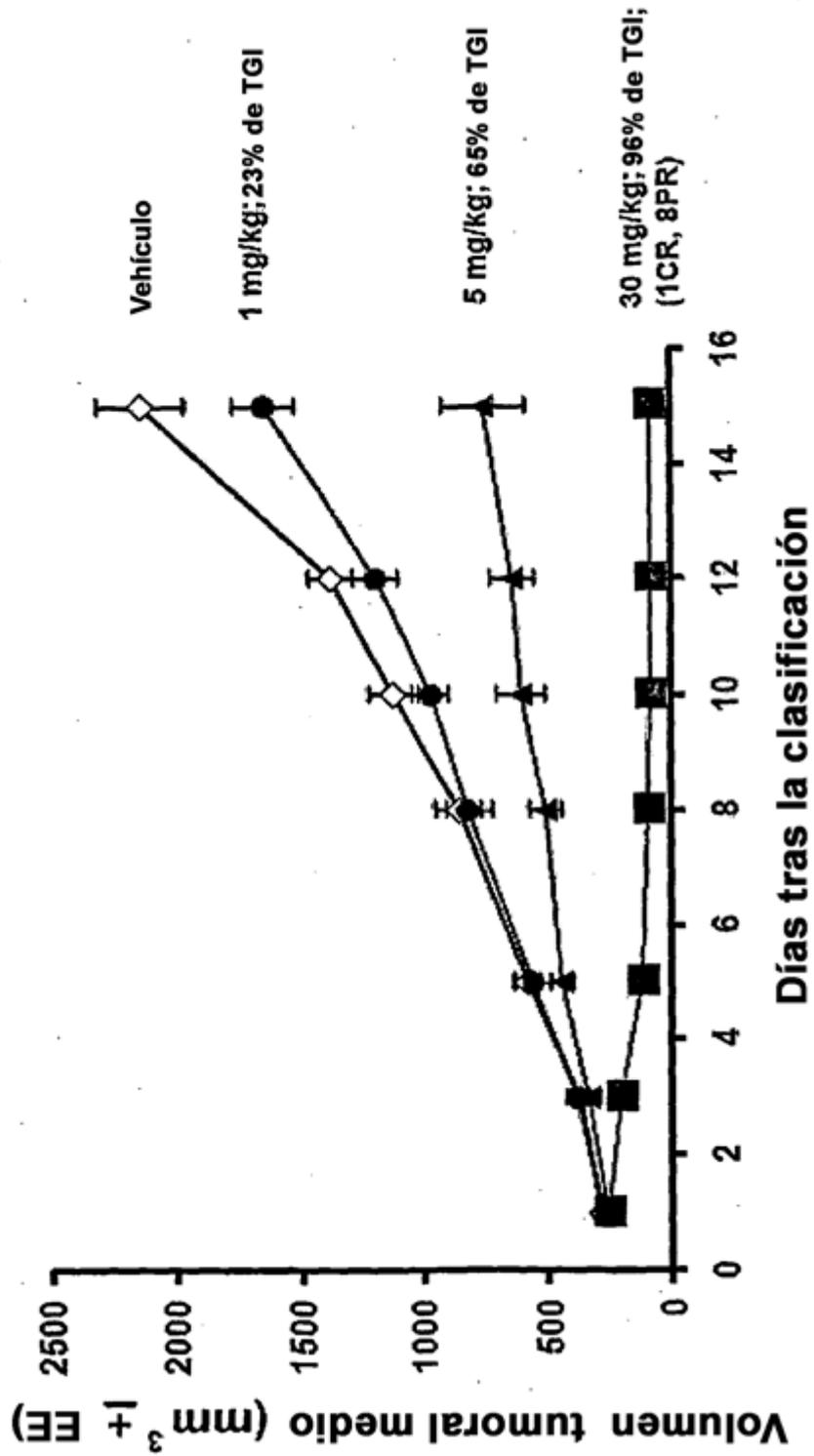


FIGURA 3

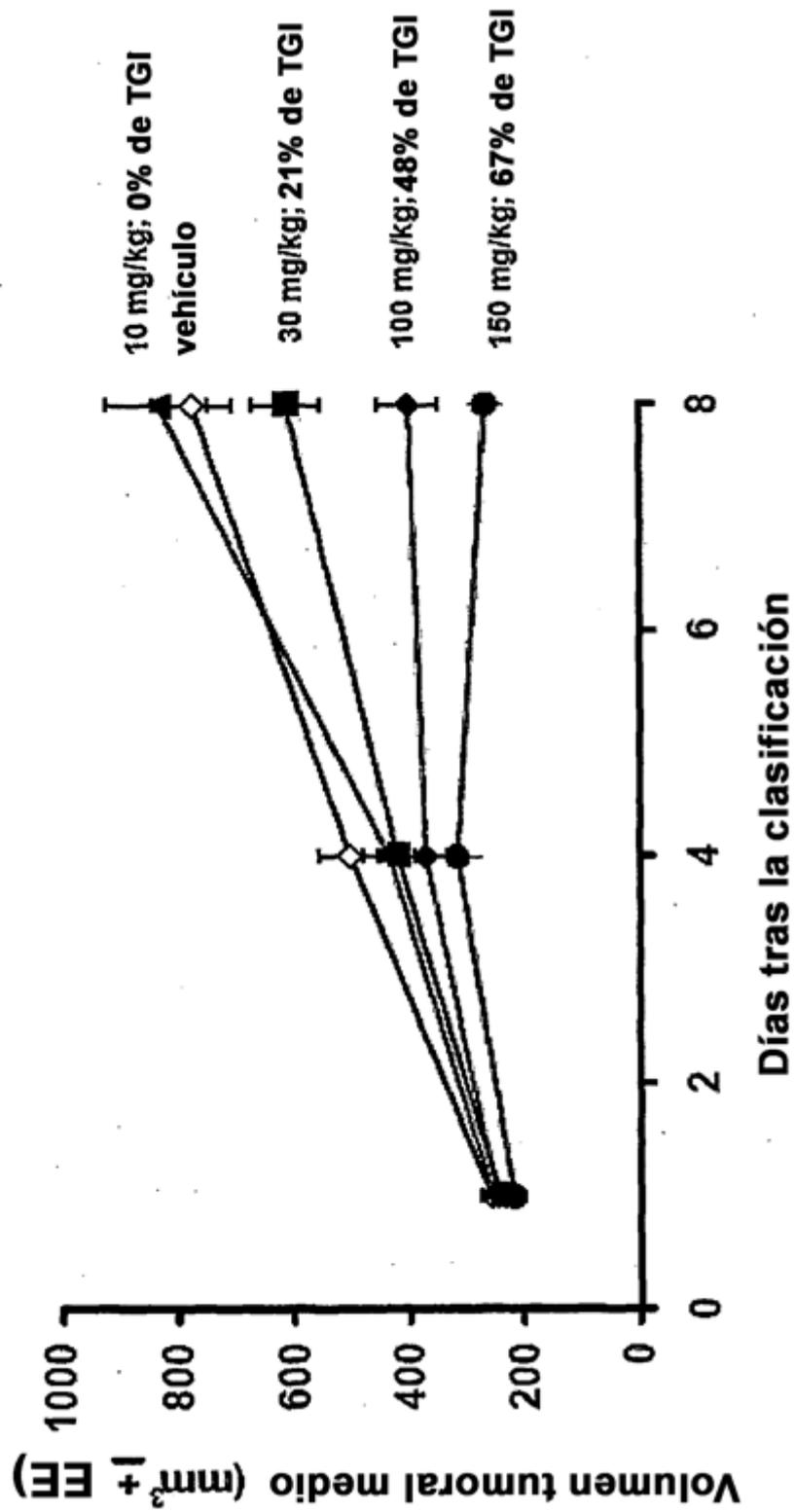


FIGURA 4

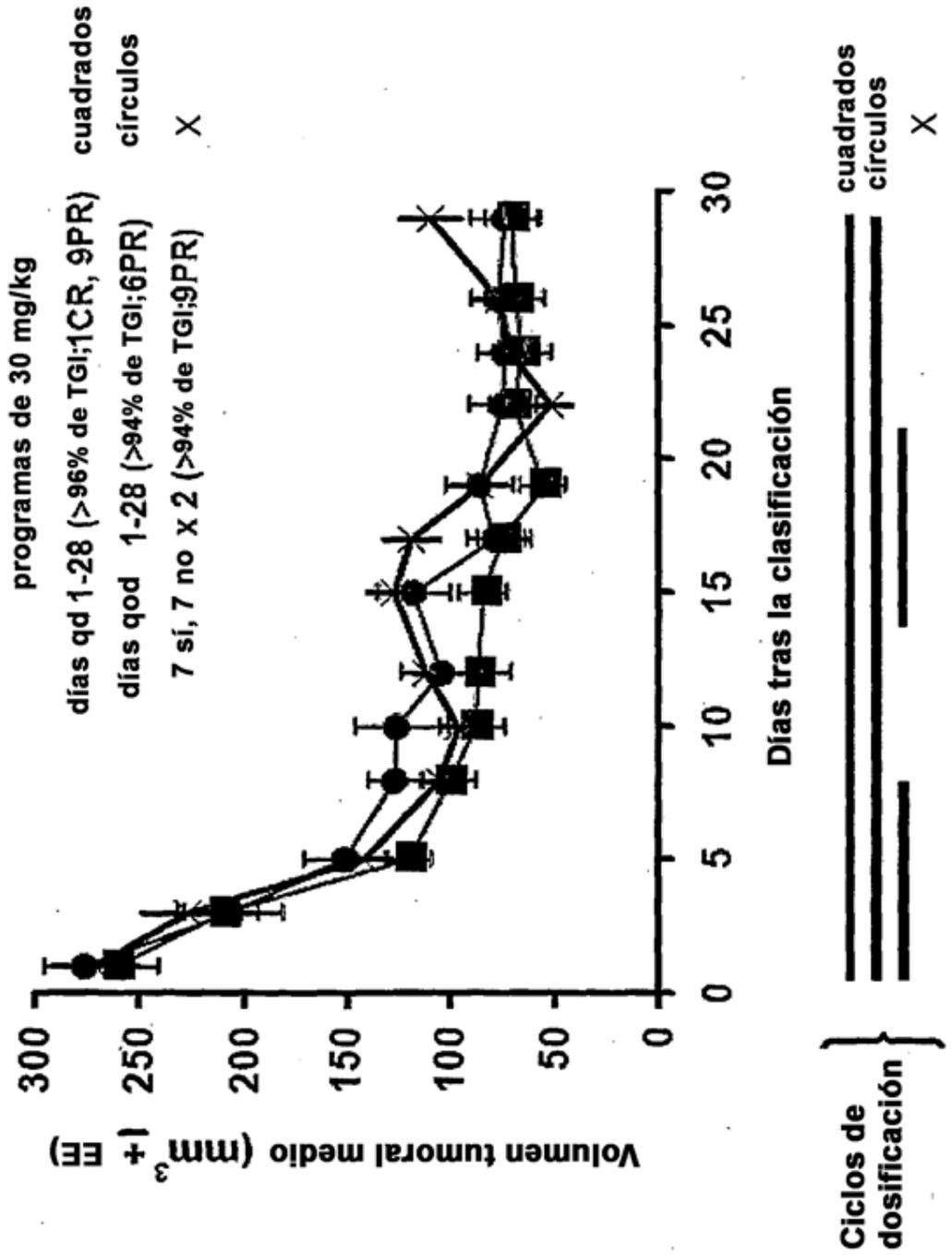


FIGURA 5

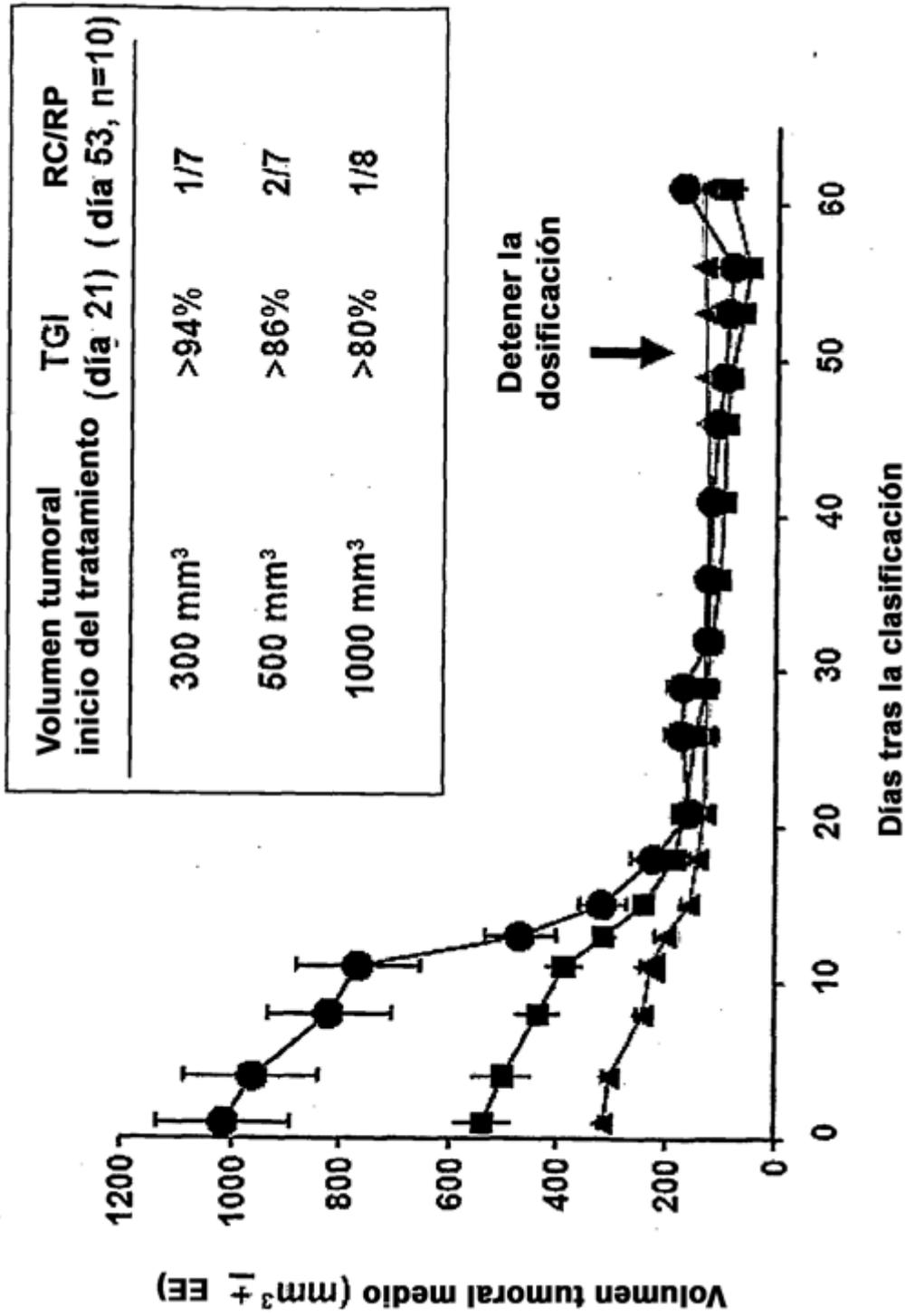


FIGURA 6

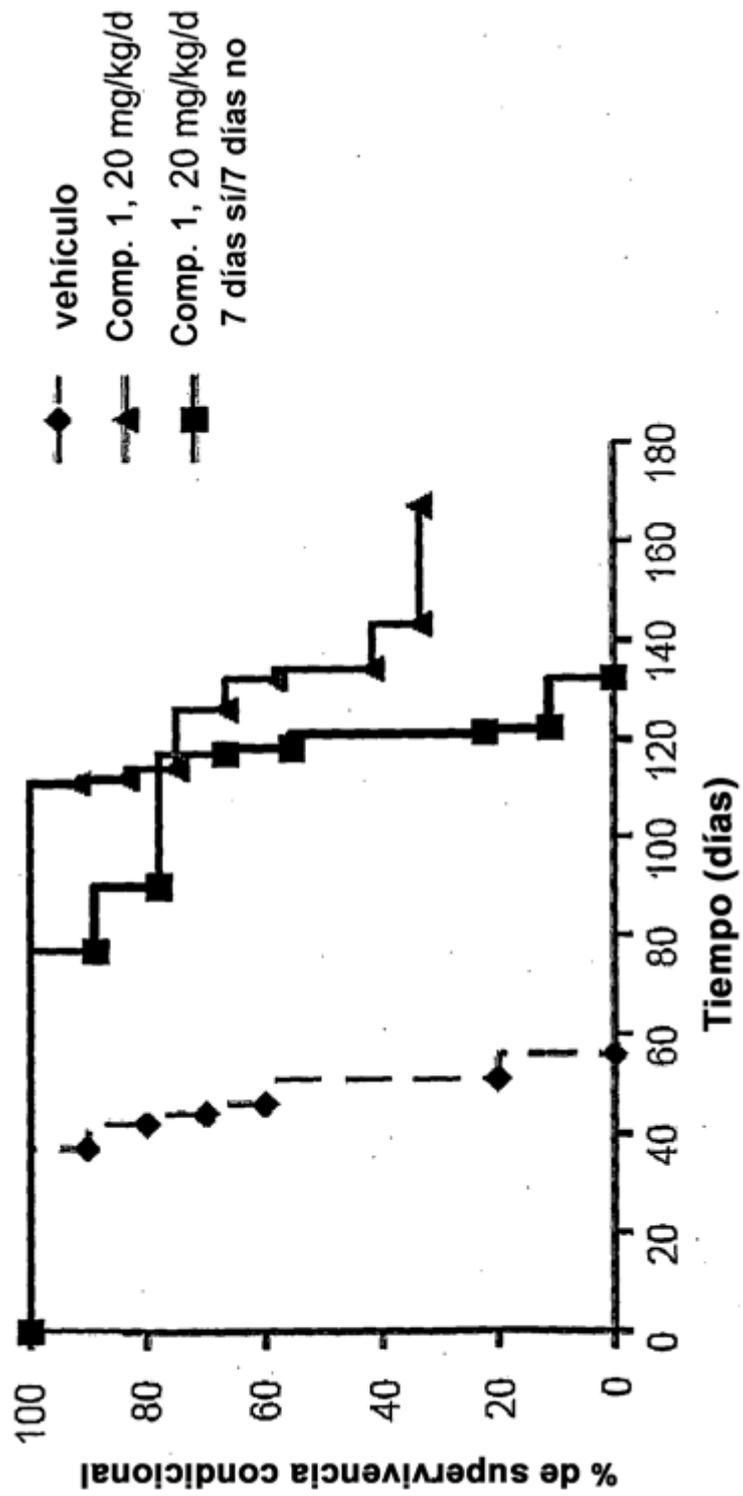


FIGURA 7

Imágenes en tiempo real de ratones (fotones/s, Xenogen)
(Recuento de fotones totales en las áreas abdominal, de la cabeza y las patas)

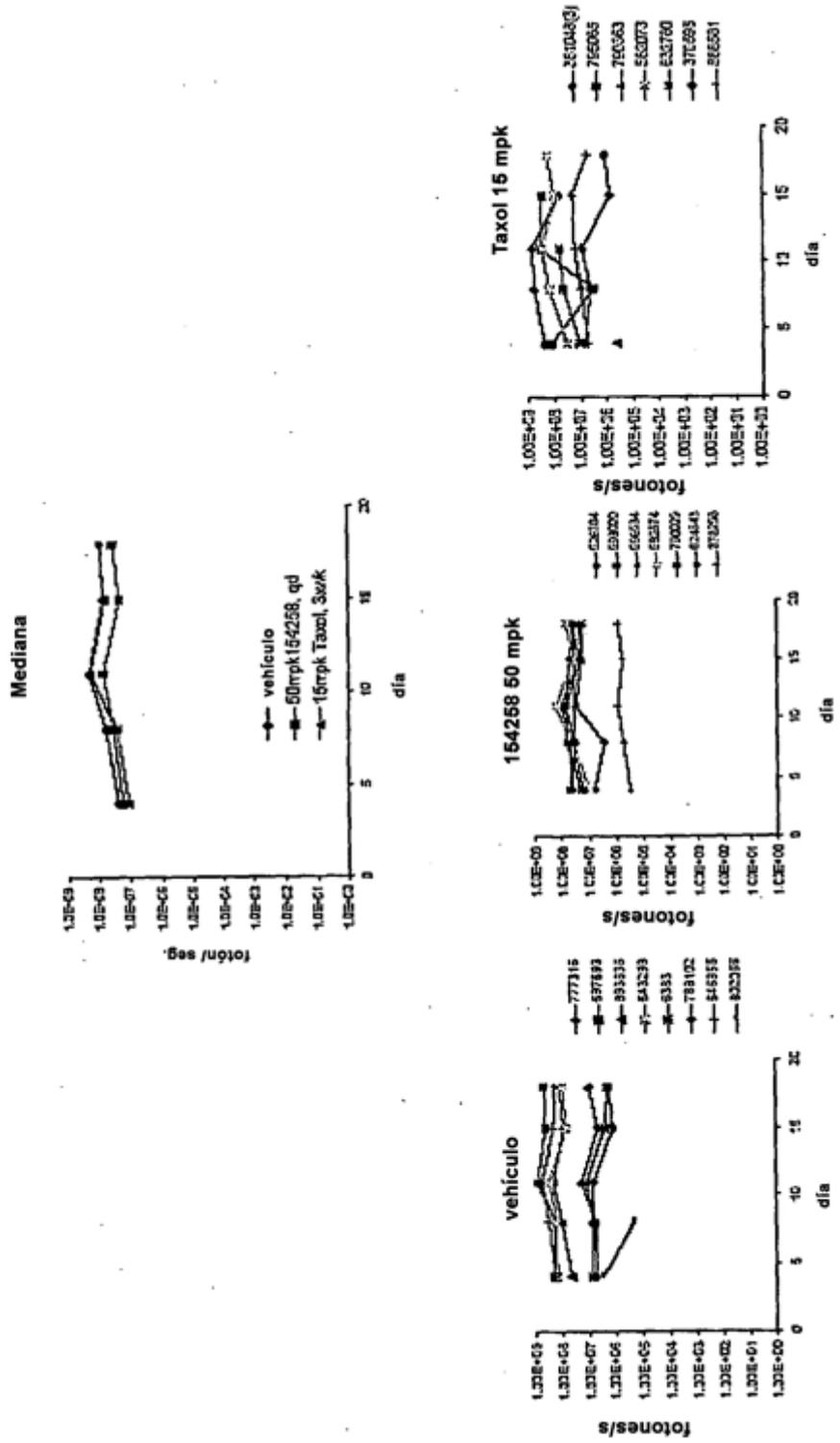


FIGURA 8

